

25 JUL 2004

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2003年7月17日 (17.07.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/057236 A1

- (51) 国際特許分類: A61K 38/00, 45/00, A61P 3/04, 3/06 [JP/JP]; 〒305-0821 茨城県つくば市春日3丁目8番地5 Ibaraki (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/13781
- (22) 国際出願日: 2002年12月27日 (27.12.2002)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2001-403260 2001年12月28日 (28.12.2001) JP
特願2002-93096 2002年3月28日 (28.03.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 武田薬品工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) [JP/JP]; 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号 Osaka (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 松本 寛和 (MATSUMOTO, Hirokazu) [JP/JP]; 〒305-0821 茨城県つくば市春日2丁目35番地10 Ibaraki (JP). 野口 次郎 (NOGUCHI, Jiro) [JP/JP]; 〒305-0051 茨城県つくば市二の宮1丁目10番地19号ファンタブルニの宮1棟205号 Ibaraki (JP). 原田 美穂子 (HARADA, Mioko) [JP/JP]; 〒305-0046 茨城県つくば市東2丁目14番地5 仕黒マンション201号 Ibaraki (JP). 森 正明 (MORI, Masaaki)
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: BODY WEIGHT GAIN INHIBITOR

(54) 発明の名称: 体重増加抑制剤

(57) Abstract: It is intended to provide a body weight gain inhibitor and so on. A ligand which is useful as an excellent body weight gain inhibitor and so on, or for screening an excellent body weight gain inhibitor and so on.

(57) 要約:

本発明は、体重増加抑制剤などの提供を目的とする。

本発明のリガンドは、優れた体重増加抑制剤などとして、あるいは優れた体重増加抑制剤などのスクリーニングなどに有用である。

WO 03/057236 A1

1

明細書

体重増加抑制剤

技術分野

- 5 本発明は体重増加抑制剤、体重減少剤、脂肪量増加抑制剤、摂食抑制剤などに関する。

背景技術

- 10 糖尿病をはじめとする生活習慣病の増加は、PPAR γ などのいわゆる俟約遺伝子に代表される飢餓状態に備えて脂肪を蓄積する方向性をもった生体機能が、現代の高脂肪食を中心とした食生活または運動不足といった生活環境に適応できなくなっていることが主な原因されている。その結果としての肥満は、糖尿病の原因となるだけでなく、高血圧などのリスクファクターともなるため、副作用の少ない安全な抗肥満薬の開発は、多くの生活習慣病の発症を防ぐことに繋がり、
- 15 医療経済的に最も要求度の高いものの一つである。こうした抗肥満薬として、現在、カテコラミン・セロトニン再取り込み阻害剤であるsibutramineおよび脂肪吸収阻害剤であるorlistatが使用されている。この他、熱産生促進薬の β 3アゴニスト、中枢性摂食抑制薬ニューロペプチドYアンタゴニスト、メラノコルチン受容体サブタイプ4アゴニストなどが開発あるいは研究途上にある (J. C. Claphamら、Pharmacol. Ther., 89巻、81-121頁、2001年、M. Chiesiら、Trends Pharmacol. Sci., 22巻、247-54頁、2001年)。
- 20

また、その他の文献として、(1) Genomics, 28巻、84-91頁、1995年、および(2) WO 01/98494号公報があげられる。

- 25 しかし、さらに新たなメカニズムに基づく作用の強力で副作用の少ない安全な体重増加抑制剤、体重減少剤の開発が望まれていた。

発明の開示

本発明者たちは上記の課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、GPR8 (Genomics, 28巻、84-91頁、1995年) と結合する内因性リガンド (WO 01/98494

号公報) が体重増加抑制活性を有することを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、

(1) 配列番号：16で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一の
5 アミノ酸配列を含有するポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステル
またはその塩を含有してなる体重増加抑制剤、

(2) 配列番号：16で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一の
アミノ酸配列を含有するポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステル
またはその塩を含有してなる体重減少剤、

10 (3) 配列番号：16で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一の
アミノ酸配列を含有するポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステル
またはその塩を含有してなる脂肪量増加抑制剤、

(4) 配列番号：16で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一の
アミノ酸配列を含有するポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステル
15 またはその塩を含有してなる摂食抑制剤、

(5) 配列番号：16で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一の
アミノ酸配列を含有するポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステル
またはその塩を用いることを特徴とする体重増加抑制剤、体重減少剤、脂肪量増
加抑制剤または摂食抑制剤のスクリーニング方法、

20 (6) さらに、配列番号：4、配列番号：126、配列番号：138または配
列番号：144で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ
酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いる上
記(5)記載のスクリーニング方法、

(7) 配列番号：16で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一の
25 アミノ酸配列を含有するポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステル
またはその塩を含有することを特徴とする体重増加抑制剤、体重減少剤、脂肪量
増加抑制剤または摂食抑制剤のスクリーニング用キット、

(8) さらに、配列番号：4、配列番号：126、配列番号：138または配
列番号：144で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ

酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有する。
上記（７）記載のスクリーニング用キット、

- （９） 上記（５）記載のスクリーニング方法または上記（７）記載のスクリー
ニング用キットを用いて得られる体重増加抑制剤、体重減少剤、脂肪量増加抑制
5 剤または摂食抑制剤、

（１０） 配列番号：１６で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一
のアミノ酸配列を含有するポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステ
ルまたはその塩の活性を有する化合物またはその塩を含有してなる体重増加抑制
剤、体重減少剤、脂肪量増加抑制剤または摂食抑制剤、

- 10 （１１） 配列番号：４、配列番号：１２６、配列番号：１３８または配列番号
：１４４で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列
を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩のアゴニストを含
有してなる体重増加抑制剤、体重減少剤、脂肪量増加抑制剤または摂食抑制剤、

- 15 （１２） 配列番号：１６で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一
のアミノ酸配列を含有するポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステ
ルまたはその塩をコードする塩基配列を含有するポリヌクレオチドを含有してな
る体重増加抑制剤、体重減少剤、脂肪量増加抑制剤または摂食抑制剤、

- 20 （１３） 配列番号：１６で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一
のアミノ酸配列を含有するポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステ
ルまたはその塩をコードする塩基配列を含有するポリヌクレオチドを用いること
を特徴とする体重増加抑制剤、体重減少剤、脂肪量増加抑制剤または摂食抑制剤
のスクリーニング方法、

- 25 （１４） 配列番号：１６で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一
のアミノ酸配列を含有するポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステ
ルまたはその塩をコードする塩基配列を含有するポリヌクレオチドを含有するこ
とを特徴とする体重増加抑制剤、体重減少剤、脂肪量増加抑制剤または摂食抑制
剤のスクリーニング用キット、

（１５） 上記（１３）記載のスクリーニング方法または上記（１４）記載のス
クリーニング用キットを用いて得られる体重増加抑制剤、体重減少剤、脂肪量増

加抑制剤または摂食抑制剤、

(16) 配列番号：149で表されるアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチド、

(17) 標識された上記(16)記載のポリペプチド、

5 (18) 上記(16)記載のポリペプチドを用いる上記(5)記載のスクリーニング方法、

(19) (i) 上記(17)記載のポリペプチド、および(ii) 配列番号：4、配列番号：126、配列番号：138または配列番号：144で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いる上記(6)記載のスクリーニング方法、

15 (20) (i) 上記(17)記載のポリペプチド、および(ii) 配列番号：4または配列番号：144で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いる上記(19)記載のスクリーニング方法、

(21) 上記(17)記載のポリペプチドおよび配列番号：144で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いる上記(20)記載のスクリーニング方法、

20 (22) 哺乳動物に対して、(i) 配列番号：16で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、(ii) 上記ポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を有する化合物またはその塩、または(iii) 配列番号：4、配列番号：126、配列番号：138または配列番号：144で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩のアゴニストの有効量を投与することを特徴とする体重増加抑制方法、体重減少方法、脂肪量増加抑制方法または摂食抑制方法、

25 (23) 体重増加抑制剤、体重減少剤、脂肪量増加抑制剤または摂食抑制剤を製造するための(i) 配列番号：16で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質

- 的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、(ii) 上記ポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を有する化合物またはその塩、または (iii) 配列番号：4、配列番号：126、配列番号：138または配列番号：144で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩のアゴニストの使用などを提供する。

図面の簡単な説明

- 10 図1は、Wakosil-II 3C18HGカラムを用いたGPR8リガンドの最終段階の精製におけるHPLCのUV吸収(a)と各ピークのGTP γ S活性(b)を示す。活性は矢印に示すピークに回収された。

図2は、種々の濃度の23残基のGPR8リガンドペプチドのヒトホモログのCHO/GPR8細胞膜画分に対するGTP γ S結合促進活性を示す。

- 15 図3は、種々の濃度の30残基のGPR8リガンドペプチドのヒトホモログのCHO/GPR8細胞膜画分に対するGTP γ S結合促進活性を示す。

図4は、種々の濃度の23残基のGPR8リガンドペプチドのヒトホモログのCHO/GPR8細胞に対するcAMP産生抑制活性を示す。

- 20 図5は、種々の濃度の30残基のGPR8リガンドペプチドのヒトホモログのCHO/GPR8細胞に対するcAMP産生抑制活性を示す。

図6は、GPR8リガンドペプチドのヒトホモログ前駆体タンパク質cDNAの全塩基配列およびそれから翻訳されるGPR8リガンドペプチドのヒトホモログ前駆体受容体タンパク質の全アミノ酸配列を示す。予想される23残基のGPR8リガンドのヒトホモログペプチドの配列を四角で示す。

- 25 図7は、GPR8リガンドペプチドのブタホモログ前駆体タンパク質cDNAの全塩基配列およびそれから翻訳されるGPR8リガンドペプチドのブタホモログ前駆体受容体タンパク質の全アミノ酸配列を示す。予想される23残基のGPR8リガンドのブタホモログペプチドの配列を四角で示す。

図8は、GPR8リガンドペプチドのラットホモログ前駆体タンパク質cDN

Aの全塩基配列およびそれから翻訳されるGPR8リガンドペプチドのラットホモログ前駆体受容体タンパク質の全アミノ酸配列を示す。予想される23残基のGPR8リガンドのラットホモログペプチドの配列を四角で示す。

- 図9は、GPR8リガンドペプチドのマウスホモログ前駆体タンパク質cDNAの全塩基配列およびそれから翻訳されるGPR8リガンドペプチドのマウスホモログ前駆体受容体タンパク質の全アミノ酸配列を示す。予想される23残基のGPR8リガンドのマウスホモログペプチドの配列を四角で示す。

- 図10は、ヒトGPR8発現CHO細胞から調製した細胞膜画分を用いた、 $[^{125}\text{I}]$ で標識した23残基のヒトGPR8リガンドに対する23残基のヒトGPR8リガンドの結合阻害活性を示す図を示す。

図11は、TGR26の疎水性プロット図である。

- 図12は、hGPR8L(1-23)およびhGPR8L(1-30)のCHO/TGR26細胞に対するcAMP産生抑制活性を示す図である。図中、-○-は、hGPR8L(1-23)を投与した場合を、-△-は、hGPR8L(1-30)を投与した場合を示す。

図13は、hGPR8L(1-23)およびhGPR8L(1-30)のCHO/TGR26細胞膜画分に対するGTP γ S結合促進活性を示す図である。図中、-○-は、hGPR8L(1-23)を投与した場合を、-△-は、hGPR8L(1-30)を混合した場合を示す。

- 図14は、 $[^{125}\text{I}]$ で標識した23残基のヒトGPR8リガンドのTGR26発現CHO細胞から調製した細胞膜画分への結合に対する種々の濃度のhGPR8L(1-23)およびhGPR8L(1-30)の結合阻害活性を示す図を示す。図中、-○-は、hGPR8L(1-23)を投与した場合を、-△-は、hGPR8L(1-30)を投与した場合を示す。

- 図15は、種々の濃度の23残基および30残基のGPR8リガンドペプチドヒトホモログのCHO/GPR7細胞に対するcAMP産生抑制活性を示す。図中、-●-は、hGPR8L(1-23)を投与した場合を、-■-は、hGPR8L(1-30)を投与した場合を示す。

図16は、 $[^{125}\text{I}]$ で標識した23残基のヒトGPR8リガンドのヒトGPR7

発現CHO細胞から調製した細胞膜画分への結合に対する種々の濃度のhGPR8L(1-23)およびhGPR8L(1-30)の結合阻害活性を示す図を示す。図中、-●-は、hGPR8L(1-23)を投与した場合を、-■-は、hGPR8L(1-30)を投与した場合を示す。

- 5 図17は、hGPR8L(1-23)およびhGPR8L(1-30)のCHO/GPR7細胞膜画分に対するGTP γ S結合促進活性を示す図である。図中、-●-は、hGPR8L(1-23)を投与した場合を、-■-は、hGPR8L(1-30)を投与した場合を示す。

- 10 図18は、皮下に持続投与したhGPR8L(1-23)のラットの明期での摂餌量に対する作用を示す。図中、□はvehicle群を、■は、hGPR8L(1-23)群を示す。

図19は、皮下に持続投与したhGPR8L(1-23)のラットの暗期での摂餌量に対する作用を示す。図中、□はvehicle群を、■は、hGPR8L(1-23)群を示す。

- 15 図20は、皮下に持続投与したhGPR8L(1-23)のラットの1日の摂餌量に対する作用を示す。図中、□はvehicle群を、■はhGPR8L(1-23)群を示す。

- 20 図21は、皮下に持続投与したhGPR8L(1-23)のラットの体重増加に対する作用を示す。図中、-○-はvehicle群を、-□-はhGPR8L(1-23)群を示す。

図22は、皮下に持続投与したhGPR8L(1-23)のラットの体重増加に対する作用を示す。図中、-○-はvehicle群を、-□-はhGPR8L(1-23)群を示す。

- 25 図23は、皮下に持続投与したhGPR8L(1-23)のラットの血中グルコース量(a)、血中総コレステロール量(b)および血中トリグリセリド濃度(c)に対する作用を示す。○は各個体の数値、-は平均値を示す。

図24は、腹腔内投与したhGPR8L(1-23)のラットの摂餌量に対する作用を示す。図中、白はvehicle群を、灰色は0.2mg投与群を、黒は2mg投与群を示す。また、*は危険率5%で有意、**は危険率1%で有意

であることを示す。

図25は、腹腔内投与したhGPR8L(1-23)のラットの体重増加量に対する作用を示す。図中、白はvehicle群を、灰色は0.2mg投与群を、黒は2mg投与群を示す。

5 図26は、[Phe², ¹²⁵I-Tyr¹⁰]ヒトGPR8リガンド(1-20)のヒトGPR7発現CHO細胞から調製した細胞膜画分への結合に対する種々の濃度のhGPR8L(1-23)およびhGPR8L(1-30)の結合阻害活性を示す図を示す。図中、-○-は、hGPR8L(1-23)を投与した場合を、-□-は、hGPR8L(1-30)を投与した場合を示す。

10 図27は、[Phe², ¹²⁵I-Tyr¹⁰]ヒトGPR8リガンド(1-20)のヒトGPR8発現CHO細胞から調製した細胞膜画分への結合に対する種々の濃度のhGPR8L(1-23)およびhGPR8L(1-30)の結合阻害活性を示す図を示す。図中、-○-は、hGPR8L(1-23)を投与した場合を、-□-は、hGPR8L(1-30)を投与した場合を示す。

15

発明を実施するための最良の形態

本発明で用いられる配列番号：1-6で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチド（以下、本発明のポリペプチドと称する場合がある）は、ヒトや温血動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）の細胞（例えば、網膜細胞、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髄細胞、メサ

20 ンギウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、

25 巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくは癌細胞など）もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、網膜、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳）、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、

副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、
顎下腺、末梢血、前立腺、睪丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など、ま
たは血球系の細胞もしくはその培養細胞（例えば、MEL, M1, CTLL-2
, HT-2, WEHI-3, HL-60, JOSK-1, K562, ML-1,
5 MOLT-3, MOLT-4, MOLT-10, CCRF-CEM, TALL-
1, Jurkat, CCRT-HSB-2, KE-37, SKW-3, HUT-
78, HUT-102, H9, U937, THP-1, HEL, JK-1, CM
K, KO-812, MEG-01など）に由来するポリペプチドであってもよく
、合成ポリペプチドであってもよい。

- 10 配列番号：16で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列とし
ては、配列番号：16で表わされるアミノ酸配列と例えば約70%以上、好まし
くは約80%以上、好ましくは約90%以上、好ましくは約95%以上、より好
ましくは約98%以上の相同性を有するアミノ酸配列などがあげられる。

特に、配列番号：16で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配
15 列としては、上記のアミノ酸配列の他、

(i) 配列番号：16で表されるアミノ酸配列中の1～5個（好ましくは1～3個
、さらに好ましくは1～2個、より好ましくは、1個）のアミノ酸が欠失したア
ミノ酸配列、

(ii) 配列番号：16で表されるアミノ酸配列に1～5個（好ましくは1～3個、
20 さらに好ましくは1～2個、より好ましくは、1個）のアミノ酸が付加したアミ
ノ酸配列、

(iii) 配列番号：16で表されるアミノ酸配列に1～5個（好ましくは1～3個
、さらに好ましくは1～2個、より好ましくは、1個）のアミノ酸が挿入された
アミノ酸配列、

25 (iv) 配列番号：16で表されるアミノ酸配列中の1～5個（好ましくは1～3個
、さらに好ましくは1～2個、より好ましくは、1個）のアミノ酸が他のアミノ
酸で置換されたアミノ酸配列、

(v) 上記(i)～(iv)を組み合わせたアミノ酸配列などがあげられる。

配列番号：16で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有

するポリペプチドとしては、例えば、前記の配列番号：16で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号：16で表わされるアミノ酸配列を有するポリペプチドと実質的に同質の活性を有するポリペプチドなどが好ましい。

- 5 実質的に同質の活性としては、例えば、本発明のポリペプチドの有する活性（例、体重増加抑制作用、体重減少作用、脂肪量増加抑制作用、摂食抑制作用）などがあげられる。

実質的に同質の活性とは、それらの活性が性質的に（例、生理化学的に、または薬理学的に）同質であることを示す。

- 10 配列番号：16で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列の具体例としては、例えば、配列番号：6、配列番号：17、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22、配列番号：23、配列番号：24、配列番号：25、配列番号：56、配列番号：57、配列番号：73、配列番号：74、配列番号：91、配列番号：92、配列番号：95、配列番号：96、配列番号：97、
15 配列番号：98、配列番号：99、配列番号：100、配列番号：101、配列番号：102、配列番号：103、配列番号：104、配列番号：105、配列番号：106、配列番号：107、配列番号：108、配列番号：109、配列番号：110、配列番号：111、配列番号：112、配列番号：113または配列番号：149で表されるアミノ酸配列などがあげられる。

- 20 本発明のポリペプチドの具体例としては、例えば、配列番号：16で表わされるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：6で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：17で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：20で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：21で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：22で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：23で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：24で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：25で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：56で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：57で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：73で表されるアミノ酸配

列を有するポリペプチド、配列番号：74で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：91で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：92で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：95で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：96で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：97で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：98で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：99で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：100で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：101で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：102で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：103で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：104で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：105で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：106で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：107で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：108で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：109で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：110で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：111で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：112で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドおよび配列番号：113で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：149で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドなどのGPR8と特異的に結合する能力を有するポリペプチドがあげられる。

また、本発明のポリペプチドは、本発明のポリペプチドの前駆体ポリペプチドをも包含する意味で用いられる。

該前駆体ポリペプチドの具体例としては、例えば、配列番号：15で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチド等があげられる。

より具体的には、

配列番号：15で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：15で表わされるアミノ酸配列と約80%以上、好ましくは約

90%以上、より好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などがあげられる。

特に、配列番号：15で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、上記のアミノ酸配列の他、

- 5 (i) 配列番号：15で表されるアミノ酸配列中の1～15個（好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個、より好ましくは、1～3個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、
- (ii) 配列番号：15で表されるアミノ酸配列に1～100個（好ましくは1～50個、さらに好ましくは1～5個、より好ましくは、1～3個）のアミノ酸が付
- 10 加したアミノ酸配列、
- (iii) 配列番号：15で表されるアミノ酸配列に1～15個（好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個、より好ましくは、1～3個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、
- (iv) 配列番号：15で表されるアミノ酸配列中の1～15個（好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個、より好ましくは、1～3個）のアミノ酸が他
- 15 のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、
- (v) 上記(i)～(iv)を組み合わせたアミノ酸配列などがあげられる。

- 配列番号：15で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列の具体例としては、例えば、配列番号：42、配列番号：55、配列番号：72または
- 20 配列番号：90で表されるアミノ酸配列などがあげられる。

- 上記前駆体ポリペプチドの具体例としては、例えば、配列番号：15で表わされるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：42で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：55で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：72で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドおよび
- 25 配列番号：90で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドなどがあげられる。

本発明のポリペプチドに対する受容体としては、種々の受容体のうち、本発明のポリペプチドと結合活性を有し、本発明のポリペプチドにより該受容体発現細胞の細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca

2^{+} 遊離、細胞内cAMP生成／抑制、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内タンパク質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下、GTP γ S結合活性などを促進する活性等）が観察されるものなどがあげられる。

- 5 具体的には、（１）GPR8（配列番号：４；Genomics、28巻、84-91頁、1995年）、またはGPR8と実質的に同一のアミノ酸配列（配列番号：４で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質）、（２）配列番号：１２６で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する受容体、（３）配列番号：１３８で表されるアミノ酸配列と同一
- 10 もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する受容体、（４）GPR7（配列番号：１４４；Genomics、28巻、84-91頁、1995年）などがあげられる。

- 配列番号：４で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質、配列番号：１２６で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質、配列番号：１３８で
- 15 表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質、配列番号：１４４で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質（以下、本発明の受容体と称する場合がある）は、ヒトや温血動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）の細胞（例えば、網膜細胞、肝細胞、
- 20 脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓 β 細胞、骨髓細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞
- 25 、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくは癌細胞など）もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、網膜、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳）、脊髓、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髓、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、

前立腺、睪丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など、または血球系の細胞
もしくはその培養細胞（例えば、MEL, M1, CTLL-2, HT-2, WE
HI-3, HL-60, JOSK-1, K562, ML-1, MOLT-3, M
OLT-4, MOLT-10, CCRF-CEM, TALL-1, Jurkat
5, CCRT-HSB-2, KE-37, SKW-3, HUT-78, HUT-1
02, H9, U937, THP-1, HEL, JK-1, CMK, KO-812
, MEG-01など）に由来するタンパク質であってもよく、合成タンパク質で
あってもよい。

配列番号：4で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列として
10 は、配列番号：4で表わされるアミノ酸配列と約70%以上、好ましくは約80
%以上、より好ましくは約90%以上の相同性を有するアミノ酸配列などがあげ
られる。

配列番号：126で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列とし
ては、例えば、配列番号：126で表されるアミノ酸配列と85%以上、好まし
15 くは約90%以上、より好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列
などが挙げられる。

配列番号：138で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列とし
ては、例えば、配列番号：138で表されるアミノ酸配列と86%以上、好まし
くは約90%以上、より好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列
20 などが挙げられる。

配列番号：144で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列と
しては、配列番号：144で表わされるアミノ酸配列と約70%以上、好ましく
は約80%以上、より好ましくは約90%以上の相同性を有するアミノ酸配列な
どがあげられる。

25 配列番号：4、配列番号：126、配列番号：138または配列番号：144
で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質と
しては、例えば、配列番号：4、配列番号：126、配列番号：138または配
列番号：144で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し
、配列番号：4、配列番号：126、配列番号：138または配列番号：144

で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

配列番号：4、配列番号：126、配列番号：138または配列番号：144
で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、(i) 配列番
5 号：4、配列番号：126、配列番号：138または配列番号：144で表され
るアミノ酸配列中の1～15個（好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～
5個、より好ましくは、1～3個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、(ii)
配列番号：4、配列番号：126、配列番号：138または配列番号：144で
表されるアミノ酸配列に1～15個（好ましくは1～10個、さらに好ましくは
10 1～5個、より好ましくは、1～3個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、(i
ii) 配列番号：4、配列番号：126、配列番号：138または配列番号：14
4で表されるアミノ酸配列に1～15個（好ましくは1～10個、さらに好まし
くは1～5個、より好ましくは、1～3個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配
列、(iv) 配列番号：4、配列番号：126、配列番号：138または配列番号：
15 144で表されるアミノ酸配列中の1～15個（好ましくは1～10個、さらに
好ましくは1～5個、より好ましくは、1～3個）のアミノ酸が他のアミノ酸で
置換されたアミノ酸配列、(v) 上記(i)～(iv)を組み合わせたアミノ酸配列などが
あげられる。

本発明の受容体の具体例としては、例えば、配列番号：4で表されるアミノ酸
20 配列を含有するタンパク質、配列番号：126で表されるアミノ酸配列を含有す
るタンパク質、配列番号：138で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質
、配列番号：144で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質などが用いら
れる。

本発明の受容体の部分ペプチド（以下、本発明の部分ペプチドと称する場合が
25 ある）としては、後述の医薬等のスクリーニング方法に用いることのできる部分
ペプチドであれば、いかなるものであっていてもよく、好ましくは、本発明のポ
リペプチドに対する結合能を有する部分ペプチド、細胞膜外領域に相当するアミ
ノ酸配列を含有する部分ペプチド等が用いられる。本発明の受容体の構成アミ
ノ酸配列のうち20個以上、好ましくは50個以上、より好ましくは100個以上

のアミノ酸配列を有するペプチドなどが好ましい。(i) 上記アミノ酸配列中の1
または2個以上(好ましくは、1~10個程度、さらに好ましくは数個(1~5
個))のアミノ酸が欠失し、(ii) 上記アミノ酸配列に1または2個以上(好ま
しくは、1~20個程度、より好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数
5 個(1~5個))のアミノ酸が付加し、または(iii) 上記アミノ酸配列中の1ま
たは2個以上(好ましくは、1~10個程度、より好ましくは数個、さらに好ま
しくは1~5個程度)のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。

具体例としては、(a) 配列番号: 4で表されるアミノ酸配列中、1番目(Met
10 ~123番目(Phe)のアミノ酸残基からなる部分アミノ酸配列もしくはその一
部、301番目(Asn)~358番目(Lys)のアミノ酸残基からなる部分アミノ
酸配列もしくはその一部、548番目(Tyr)~593番目(Arg)のアミノ酸残
基からなる部分アミノ酸配列もしくはその一部、および843番目(Ala)~89
5番目(Ile)のアミノ酸残基からなる部分アミノ酸配列もしくはその一部から選
択される1または2以上の部分アミノ酸配列を含有する部分ペプチド、(b) 配列
15 番号: 126で表されるアミノ酸配列中、1番目(Met)~85番目(Asp)のア
ミノ酸残基からなる部分アミノ酸配列もしくはその一部、または222番目(Cy
s)~329番目(Ala)のアミノ酸残基からなる部分アミノ酸配列もしくはその
一部を含有するペプチドなどがあげられる。

本発明のポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドは、ペプチド標記の慣
20 例に従って左端がN末端(アミノ末端)、右端がC末端(カルボキシル末端)で
ある。本発明のポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドは、C末端がカル
ボキシル基($-\text{COOH}$)、カルボキシレート($-\text{COO}^-$)、アミド($-\text{CONH}_2$)またはエステル($-\text{COOR}$)の何れであってもよい。

ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、n-プロピル
25 、イソプロピルもしくはn-ブチルなどの C_{1-6} アルキル基、例えば、シクロペ
ンチル、シクロヘキシルなどの C_{3-8} シクロアルキル基、例えば、フェニル、 α -
ナフチルなどの C_{6-12} アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェ
ニル- C_{1-2} アルキル基もしくは α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル- C_{1-2}
アルキル基などの C_{7-14} アララルキル基のほか、経口用エステルとして汎用され

るピバロイルオキシメチル基などが用いられる。

本発明のポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドがC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のポリペプチドに含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明のポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドには、N末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC₁₋₆アルカノイルなどのC₁₋₆アシル基など）で保護されているもの、生体内で切断されて生成するN末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば-OH、-SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC₁₋₆アルカノイル基などのC₁₋₆アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。

本発明のポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドの塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸）や塩基（例、アルカリ金属塩）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

本発明のポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドは、前述したヒトや温血動物の細胞または組織から公知のポリペプチドの精製方法によって製造することもできるし、後述するポリペプチドをコードするDNAで形質転換された形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。

ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み

合わせることにより精製単離することができる。

本発明のポリペプチド、受容体、その部分ペプチド、もしくはそれらの塩、またはそれらのアミド体の合成には、通常市販のポリペプチド合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などをあげることができる。このような樹脂を用い、 α -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするポリペプチドの配列通りに、公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からポリペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のポリペプチド、受容体、部分ペプチドまたはそれらのアミド体を取得する。

上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、ポリペプチド合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N, N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤(例えば、HOBt、HOObt)とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはHOObtエステルあるいはHOObtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、ポリペプチド縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエー

テル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はポリペプチド結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約 -20°C ～ 50°C の範囲から適宜選択される。活性化され

- 5 たアミノ酸誘導体は通常1.5～4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行なうことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することによって、後の反応に影響を与えないようにすることができる。

- 10 原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、*t*-ベンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、C1-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。

- カルボキシ基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、*t*-ブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化）、アラルキルエステル化（例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化）、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、*t*-ブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによつて保護することができる。

- 25 セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によつて保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級（ C_{1-6} ）アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、*t*-ブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、 Bz 、 Cl_2 、 Bz 、2-ニトロベンジル、 $Br-Z$ 、 t -ブチルなどが用いられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、 Tos 、4-メトキシ-2, 3, 6-トリメチルベンゼンスルホニル、 DNP 、ベンジルオキシメチル、 Bum 、 Boc 、 Trt 、 $Fmoc$ などが用いられる。

原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（例えば、ペンタクロロフェノール、2, 4, 5-トリクロロフェノール、2, 4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、 $HONB$ 、 N -ヒドロキシスクシミド、 N -ヒドロキシフタルイミド、 $HOBT$ ）とのエステル〕などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。

保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、 Pd -黒あるいは Pd -炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約 $-20^{\circ}C \sim 40^{\circ}C$ の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1, 4-ブタンジチオール、1, 2-エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2, 4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1, 2-エタンジチオール、1, 4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から

適宜選択しうる。

本発明のポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドのアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド（ポリペプチド）鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の α -アミノ基の保護基のみを除いたポリペプチドとC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去したポリペプチドとを製造し、この両ポリペプチドを上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護ポリペプチドを精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗ポリペプチドを得ることができる。この粗ポリペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドのアミド体を得ることができる。

本発明のポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドのエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、ポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドのアミド体と同様にして、所望のポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドのエステル体を得ることができる。

本発明のポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドは、公知のペプチドの合成法に従って、あるいは受容体の部分ペプチドについては、受容体を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明のポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の(a)～(e)に記載された方法があげられる。

(a) M. Bodanszky および M. A. Ondetti、ペプチド・シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)

(b) SchroederおよびLuebke、ザ・ペプチド (The Peptide), Academic Press, N

ew York (1965年)

(c) 泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

(d) 矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)

5 (e) 矢島治明監修、続医薬品の開発、第14巻、ペプチド合成、広川書店

また、反応後は通常の精製法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明のポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られるポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドが遊離体である場合は、
10 公知の方法あるいはそれに準じる方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって遊離体または他の塩に変換することができる。

本発明のポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドをコードするDNAとしては、前述した本発明のポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲ
15 ノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。

ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コス
20 ミド、フေးジミドなどいずれであってよい。また、前記した細胞・組織よりtotal RNAまたはmRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する) によって増幅することもできる。

本発明のポリペプチドをコードするDNAとしては、例えば (a) 配列番号：1
25 8、配列番号：19、配列番号：26、配列番号：27、配列番号：28、配列番号：29、配列番号：30、配列番号：31、配列番号：58、配列番号：59、配列番号：75、配列番号：76、配列番号：93、配列番号：94、配列番号：114、配列番号：115、配列番号：116、配列番号：117、配列番号：118、配列番号：119、配列番号：120、配列番号：121、配列

番号：122、配列番号：123、配列番号：124、配列番号：125または配列番号：150で表わされる塩基配列を含有するDNA、(b) 配列番号：18、配列番号：19、配列番号：26、配列番号：27、配列番号：28、配列番号：29、配列番号：30、配列番号：31、配列番号：58、配列番号：59、配列番号：75、配列番号：76、配列番号：93、配列番号：94、配列番号：114、配列番号：115、配列番号：116、配列番号：117、配列番号：118、配列番号：119、配列番号：120、配列番号：121、配列番号：122、配列番号：123、配列番号：124、配列番号：125または配列番号：150で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のポリペプチドと実質的に同質の活性を有するポリペプチドをコードするDNA、(c) 配列番号：14、配列番号：41、配列番号：54、配列番号：71または配列番号：89で表わされる塩基配列を含有するDNA、または(d) 配列番号：14、配列番号：41、配列番号：54、配列番号：71または配列番号：89で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有するDNAなどであれば何れのものでもよい。

(i) 配列番号：18、配列番号：19、配列番号：26、配列番号：27、配列番号：28、配列番号：29、配列番号：30、配列番号：31、配列番号：58、配列番号：59、配列番号：75、配列番号：76、配列番号：93、配列番号：94、配列番号：114、配列番号：115、配列番号：116、配列番号：117、配列番号：118、配列番号：119、配列番号：120、配列番号：121、配列番号：122、配列番号：123、配列番号：124、配列番号：125または配列番号：150で表わされる塩基配列、または(ii) 配列番号：14、配列番号：41、配列番号：54、配列番号：71または配列番号：89で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、それぞれ(i) 配列番号：18、配列番号：19、配列番号：26、配列番号：27、配列番号：28、配列番号：29、配列番号：30、配列番号：31、配列番号：58、配列番号：59、配列番号：75、配列番号：76、配列番号：93、配列番号：94、配列番号：114、配列

- 番号：115、配列番号：116、配列番号：117、配列番号：118、配列番号：119、配列番号：120、配列番号：121、配列番号：122、配列番号：123、配列番号：124、配列番号：125または配列番号：150で表される塩基配列、または(ii)配列番号：14、配列番号：41、配列番号：54、配列番号：71または配列番号：89で表わされる塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

- ハイブリダイゼーションは、公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989)に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。

- ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19~40 mM、好ましくは約19~20 mMで、温度が約50~70℃、好ましくは約60~65℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19 mMで温度が約65℃の場合が最も好ましい。

より具体的には、

- (i) 配列番号：16で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：18で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、
- (ii) 配列番号：17で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：19で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、
- (iii) 配列番号：20で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：26で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、
- (iv) 配列番号：21で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：27で表わされる塩基配列を含有するDNAな

どが用いられ、

(v) 配列番号：22で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：28で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、

- 5 (vi) 配列番号：23で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：29で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、

- (vii) 配列番号：24で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：30で表わされる塩基配列を含有するDNA
10 などが用いられ、

(viii) 配列番号：25で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：31で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、

- (ix) 配列番号：56で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコード
15 するDNAとしては、配列番号：58で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、

(x) 配列番号：57で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：59で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、

- 20 (xi) 配列番号：73で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：75で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、

(xii) 配列番号：74で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：76で表わされる塩基配列を含有するDNA

- 25 などが用いられ、

(xiii) 配列番号：91で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：93で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、

(xiv) 配列番号：92で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコー

ドするDNAとしては、配列番号：94で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、

- (xv) 配列番号：95で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：18で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、

(xvi) 配列番号：96で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：114で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、

- (xvii) 配列番号：97で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：115で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、

(xviii) 配列番号：98で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：116で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、

- (xix) 配列番号：99で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：117で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、

- (xx) 配列番号：100で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：118で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、

(xxi) 配列番号：101で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：119で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、

- (xxii) 配列番号：102で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：120で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、

(xxiii) 配列番号：103で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：58で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、

- (xxiv) 配列番号: 104 で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号: 75 で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、
- 5 (xxv) 配列番号: 105 で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号: 18 で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、
- (xxvi) 配列番号: 106 で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号: 18 で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、
- 10 (xxvii) 配列番号: 107 で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号: 121 で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、
- (xxviii) 配列番号: 108 で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号: 122 で表わされる塩基配列を含有する
- 15 DNAなどが用いられ、
- (xxix) 配列番号: 109 で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号: 123 で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、
- (xxx) 配列番号: 110 で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号: 124 で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、
- 20 (xxxi) 配列番号: 6 で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号: 125 で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、
- 25 (xxxii) 配列番号: 111 で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号: 121 で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、
- (xxxiii) 配列番号: 112 で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号: 18 で表わされる塩基配列を含有するD

NAなどが用いられ、

(xxxiv) 配列番号：113で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：121で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、

- 5 (xxxv) 配列番号：149で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：150で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

- 本発明の受容体をコードするDNAとしては、例えば、(1) 配列番号：32で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：32で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：4で表されるアミノ酸を含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質をコードするDNA、(2) 配列番号：127で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：32で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：126で表されるアミノ酸を含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質をコードするDNA、(3) 配列番号：139で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：139で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：138で表されるアミノ酸を含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質をコードするDNA、(4) 配列番号：143で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：143で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：143で表されるアミノ酸を含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質をコードするDNAなどであれば何れのものでもよい。

- 25 配列番号：32、配列番号：127、配列番号：139または配列番号：143で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、それぞれ配列番号：32、配列番号：127、配列番号：139または配列番号：143で表わされる塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95

%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

ハイブリダイゼーションは、公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989)に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。

ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19～40 mM、好ましくは約19～20 mMで、温度が約50～70℃、好ましくは約60～65℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19 mMで温度が約65℃の場合が最も好ましい。

より具体的には、配列番号：4で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：32で表わされる塩基配列を含有するDNA、配列番号：126で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：127で表わされる塩基配列を含有するDNA、配列番号：138で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：139で表わされる塩基配列を含有するDNA、配列番号：144で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：143で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

本発明の受容体の部分ペプチドをコードするDNAとしては、前述した本発明の受容体の部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。

本発明の受容体の部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、(1)配列番号：32で表わされる塩基配列を有するDNAの部分塩基配列を有するDNA、または配列番号：32で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：4で表されるアミノ酸を

- 含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質をコードするDNAの部分塩基配列を有するDNA、(2) 配列番号：127で表わされる塩基配列を有するDNAの部分塩基配列を有するDNA、または配列番号：127で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：126で表されるアミノ酸を含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質をコードするDNAの部分塩基配列を有するDNA、(3) 配列番号：139で表わされる塩基配列を有するDNAの部分塩基配列を有するDNA、または配列番号：138で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：126で表されるアミノ酸を含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質をコードするDNAの部分塩基配列を有するDNA、(4) 配列番号：143で表わされる塩基配列を有するDNAの部分塩基配列を有するDNA、または配列番号：143で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：144で表されるアミノ酸を含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質をコードするDNAの部分塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

配列番号：32、配列番号：127、配列番号：139または配列番号：143で表わされる塩基配列とハイブリダイズできるDNAは、前記と同意義を示す。

- 20 ハイブリダイゼーションの方法およびハイストリンジェントな条件は前記と同様のものが用いられる。

- また、本発明の受容体の部分ペプチドをコードするDNAとしてより具体的には、配列番号：4で表されるアミノ酸配列中、1番目(Met)～43番目(Phe)、101番目(Asn)～118番目(Lys)、188番目(Tyr)～213番目(Arg)および283番目(Ala)～295番目(Ile)で表される部分アミノ酸配列から選択される1または2以上の部分アミノ酸配列を含有する部分ペプチドをコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNA、またはこれらとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有するDNAを含有するDNAなどがあげられる。

本発明のポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドをコードするDNAは、公知の方法で標識化されていてもよく、具体的にはアイソトープラベル化されたもの、蛍光標識されたもの（例えば、フルオレセインなどによる蛍光標識）、ビオチン化されたものまたは酵素標識されたものなどがあげられる。好ましくは

5 アイソトープラベル化された本発明のポリペプチドが用いられる。

本発明のポリペプチド、受容体またはその部分ペプチド（以下、これらポリペプチド等をコードするDNAのクローニングおよび発現の説明においては、これらポリペプチド等を単に本発明のポリペプチドと略記する場合がある）を完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明のポリペプチドの部分

10 塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いて公知のPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを本発明のポリペプチドの一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したもののハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning

15) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

DNAの塩基配列の変換は、公知のキット、例えば、MutanTM-super Express Km (宝酒造 (株))、MutanTM-K (宝酒造 (株)) 等を用いて、ODA-LA PCR法、Gapped duplex法、Kunkel法等の公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。

20

クローン化されたポリペプチドをコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、

25 また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有している。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

本発明のポリペプチドの発現ベクターは、例えば、(イ) 本発明のポリペプチドをコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ) 該DNA断

片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド（例、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13）、枯草菌由来のプラスミド（例、pUB110、pTP5、pC194）、酵母由来プラスミド（例、pSH19、pSH15）、入ファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNA1/Neoなどが用いられる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SR α プロモーター、SV40プロモーター、HIV-LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどがあげられる。

これらのうち、CMV（サイトメガロウイルス）プロモーター、SR α プロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 λ PLプロモーター、lppプロモーター、T7プロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン（以下、SV40oriと略称する場合がある）などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、dhfrと略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、Amp^rと略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、Neo^rと略称する場合がある、G418耐性）等があげられる。特に、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞を用いてdhfr遺伝子

を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のポリペプチドの N 末端側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 α -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、MF α ・シグナル配列、SUC2・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、 α -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

10 このようにして構築された本発明のポリペプチドをコードする DNA を含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌の具体例としては、例えば、エシェリヒア・コリ (Escherichia coli) K12・DH1 [プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 60 巻, 160 (1968)], JM103 [ヌクレック・アシッドズ・リサーチ (Nucleic Acids Research), 9 巻, 309 (1981)], JA221 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology)], 120 巻, 517 (1978)], HB101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41 巻, 459 (1969)], C600 [ジェネティックス (Genetics), 39 巻, 440 (1954)] などが用いられる。

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サブチルス (Bacillus subtilis) MI114 [ジーン, 24 巻, 255 (1983)], 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95 巻, 87 (1984)] などが用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) AH22, AH22R⁻, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12, シゾサッカロマイセス・ポンベ (Schizosaccharomyces pombe) NCYC1

913, NCYC2036、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) KM71などが用いられる。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、ヨトウガの幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell; Sf細胞)、*Trichoplusia ni*の中腸由来のMG1細胞、*Trichoplusia ni*の卵由来のHigh FiveTM細胞、*Mamestra brassicae*由来の細胞または*Estigmena acrea*由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、カイコ由来株化細胞 (*Bombyx mori* N細胞; BmN細胞) などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL1711)、Sf21細胞 (以上、Vaughn, J.L. ら、イン・ヴィボ (In Vivo), 13, 213-217, (1977)) などが用いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる [前田ら、ネイチャー (Nature), 315巻, 592 (1985)]。

動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7, Vero, チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO細胞と略記), dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO (dhfr-) 細胞と略記), マウスL細胞; マウスAtT-20, マウスミエローマ細胞, ラットGH3, ヒトFL細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69巻, 2110 (1972) やジーン (Gene), 17巻, 107 (1982) などに記載の方法に従って行なうことができる。

バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティクス (Molecular & General Genetics), 168巻, 111 (1979) などに記載の方法に従って行なうことができる。

25 酵母を形質転換するには、例えば、メソッズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 194巻, 182-187 (1991)、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75巻, 1929 (1978) などに記載の方法に従って行なうことができる。

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオ／テクノロジー (Bio/Technology, 6, 47-55 (1988)) などに記載の方法に従って行なうことができる。

動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊 8 新細胞工学実験プロトコル、263-267 (1995) (秀潤社発行)、ヴィロロジー (Virology), 52巻, 456 (1973) に記載の方法に従って行なうことができる。

このようにして、ポリペプチドをコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得ることができる。

宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどがあげられる。また、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5~8が望ましい。

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地 [ミラー (Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティクス (Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1972] が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3 β -インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。

宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15~43℃で約3~24時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30~40℃で約6~24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホルダー (Burkholder) 最小培地 (Bostian, K. L. ら、プロシーディングズ・オブ

・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77巻, 4505 (1980)] や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地 [Bitter, G. A. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81巻, 5330 (1984)] があげられる。
5 培地のpHは約5~8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃~35℃で約24~72時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T. C. C., ネイチャー (Nature), 195, 788 (1962)) に
10 非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2~6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3~5日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約5~20%の胎児牛血清を含むMEM培地 [サイエンス (Science), 122巻, 501 (1952)], DMEM培地 [ヴィロロジー (Virology), 8巻, 396 (1959)], RPMI 1640培地 [ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199巻, 519 (1967)], 199培地 [プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディスン (Proceeding of the
20 Society for the Biological Medicine), 73巻, 1 (1950)] などが用いられる。pHは約6~8であるのが好ましい。培養は通常約30℃~40℃で約15~60時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

以上のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜または細胞外などに本発明のポリペプチドを生成せしめることができる。

25 上記培養物から本発明のポリペプチドを分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。

本発明のポリペプチドを培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび/または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊し

- たのち、遠心分離やろ過によりポリペプチドの粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどのタンパク質変性剤や、トリトンX-100TMなどの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にポリペプチドが分泌される場合には、培養終了後、公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

- このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるポリペプチドの精製は、公知の分離・精製法を適宜組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

- かくして得られるポリペプチドが遊離体で得られた場合には、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

- なお、組換え体が産生するポリペプチドを、精製前または精製後に適当なタンパク修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。タンパク修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

- 本発明のポリペプチドに対する抗体（以下、単に本発明の抗体と称する場合がある）は、本発明のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩に対する抗体を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。

本発明のポリペプチドに対する抗体は、本発明のポリペプチドを抗原として用い、公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

〔モノクローナル抗体の作製〕

(a) モノクローナル抗体産生細胞の作製

- 本発明のポリペプチドは、温血動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリがあげられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。
- モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原で免疫された温血動物、例えばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を同種または異種動物の骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化ポリペプチドと抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー (Nature)、256、495 (1975)〕に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール (PEG) やセンダイウィルスなどがあげられるが、好ましくはPEGが用いられる。
- 骨髓腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1などの温血動物の骨髓腫細胞があげられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞 (脾臓細胞) 数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1:1～20:1程度であり、PEG (好ましくはPEG1000～PEG6000) が10～80%程度の濃度で添加され、20～40℃、好ましくは30～37℃で1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。
- モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、ポリペプチド (タンパク質) 抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相 (例、マイクロプレート) にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識された抗免疫グロブリン抗体 (細胞融合に

- 用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる) またはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識されたポリペプチドを加え、固相
- 5 に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などがあげられる。

- モノクローナル抗体の選別は、公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。通常HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地で行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば
- 10 、1～20%、好ましくは10～20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1～10%の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工業（株））あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、日水製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、
- 15 通常5%炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

（b）モノクローナル抗体の精製

- モノクローナル抗体の分離精製は、公知の方法、例えば、免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行なうことができる。
- 20

〔ポリクローナル抗体の作製〕

- 25 本発明のポリクローナル抗体は、公知あるいはそれに準じる方法に従って製造することができる。例えば、免疫抗原（ポリペプチド抗原）自体、あるいはそれとキャリアタンパク質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に温血動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のポリペプチドに対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造することが

できる。

温血動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアタンパク質との複合体に関し、キャリアタンパク質の種類およびキャリアとハプテンとの混合比は、キャリアに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、5 どの様なものをどの様な比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1～20、好ましくは約1～5の割合でカプルさせる方法が用いられる。

また、ハプテンとキャリアのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオピリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。10

縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行なわれる。

15 ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された温血動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。

抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。20

本発明のポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドをコードするDNA（以下、これらのDNAを本発明のDNAと略記する場合がある）に相補的な、または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含有するアンチセンスポリヌクレオチド（好ましくはDNA（以下、これらのDNAを、本発明のアンチセンス25 DNAと略記する場合がある））としては、本発明のDNAに相補的な、または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含有し、該DNAの発現を抑制し得る作用を有するものであれば、いずれのアンチセンスポリヌクレオチド（好ましくは、アンチセンスDNA）であってもよい。

本発明のDNAに実質的に相補的な塩基配列とは、例えば、本発明のDNAに

相補的な塩基配列（すなわち、本発明のDNAの相補鎖）の全塩基配列あるいは部分塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列などがあげられる。特に、本発明のDNAの相補鎖の全塩基配列うち、（イ）翻訳阻害を指向し

- 5 たアンチセンスヌクレオチドの場合は、本発明のタンパク質のN末端部位をコードする部分の塩基配列（例えば、開始コドン付近の塩基配列など）の相補鎖と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアンチセンスヌクレオチドが、（ロ）RNase HによるRNA分解を指向するアンチセンスヌクレオチドの場合は、イン
- 10 トロンを含む本発明のDNAの全塩基配列の相補鎖と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアンチセンスヌクレオチドがそれぞれ好適である。例えば、本発明のポリペプチドまたは受容体をコードする塩基配列を含有するDNAの塩基配列に相補的な、もしくは実質的に相補的な塩基配列、またはその一部分を有するア
- 15 ンチセンスヌクレオチド（DNA）が挙げられる。

アンチセンスヌクレオチドは通常、10～40個程度、好ましくは15～30個程度の塩基から構成される。

本発明のアンチセンスDNAは、公知のDNA合成装置などを用いて製造することができる。

- 20 以下に、（a）本発明のポリペプチド、（b）本発明のDNA、（c）本発明の抗体および（d）本発明のアンチセンスDNAの用途を説明する。

（1）本発明のポリペプチドが関与する各種疾病の治療・予防剤

- 本発明のポリペプチドは、本発明の受容体（例、GPR8、GPR7、ラットTGR26、マウスTGR26など）の発現細胞の細胞刺激活性を有し、本発明
- 25 の受容体の内因性リガンドである。

従って本発明のポリペプチドまたは本発明のDNAに異常があったり、欠損している場合、または本発明の受容体または該受容体をコードするDNAに異常があったり、欠損している場合には、例えば、体重増加となる可能性が高い。従って、本発明のポリペプチドおよび本発明のDNAは、例えば、体重増加抑制剤、

体重減少剤、脂肪量増加抑制剤、摂食抑制剤として使用することができる。また、例えば肥満症〔例、悪性肥満細胞症 (malignant mastocytosis)、外因性肥満 (exogenous obesity)、過インシュリン性肥満症 (hyperinsular obesity)、過血漿性肥満 (hyperplasmic obesity)、下垂体性肥満 (hypophyseal adiposity)、減血漿性肥満症 (hypoplasmic obesity)、甲状腺機能低下肥満症 (hypothyroid obesity)、視床下部性肥満 (hypothalamic obesity)、症候性肥満症 (symptomatic obesity)、小児肥満 (infantile obesity)、上半身肥満 (upper body obesity)、食事性肥満症 (alimentary obesity)、性機能低下性肥満 (hypogonadal obesity)、全身性肥満細胞症 (systemic mastocytosis)、単純性肥満 (simple obesity)、中心性肥満 (central obesity) など〕の予防治療剤として使用することができる。

本発明のポリペプチドおよび本発明のDNAは、例えば、生体内において本発明のポリペプチドが減少あるいは欠損している患者がいる場合に、(イ) 本発明のDNAを該患者に投与し、生体内で本発明のポリペプチドを発現させることによって、(ロ) 細胞に本発明のDNAを挿入し、本発明のポリペプチドを発現させた後に、該細胞を患者に移植することによって、または(ハ) 本発明のポリペプチドを該患者に投与することなどによって、該患者における本発明のポリペプチドの役割を十分に、あるいは正常に発揮させることができる。

本発明のDNAを上記の治療・予防剤として使用する場合は、該DNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って、ヒトまたは温血動物に投与することができる。本発明のDNAは、そのまま、あるいは摂取促進のための補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

本発明のポリペプチドを上記の治療・予防剤として使用する場合は、少なくとも90%、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、さらに好ましくは99%以上に精製されたものを使用するのが好ましい。

本発明のポリペプチドは、例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル

剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的（好ましくは皮下投与）に使用できる。例えば、本発明のポリペプチドを生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。

注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などがあげられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例えば、エタノールなど）、ポリアルコール（例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、非イオン性界面活性剤（例えば、ポリソルベート 80TM、HCO-50 など）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液など）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。

本発明のDNAが挿入されたベクターも上記と同様に製剤化され、通常、非経口的に使用される。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、など）に対して投与することができる。

本発明のポリペプチドの投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、体重増加抑制の目的で本発明のポリペプチドを皮下投与する場合、一般的に成人（60kgとして）においては、一日につき該ポリペプチドを約0.1mg～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

(2) 疾病に対する医薬候補化合物のスクリーニング

本発明のポリペプチドは本発明の受容体のリガンドとしての機能などを有するため、本発明のポリペプチドの活性や機能を促進する化合物またはその塩は、例えば、体重増加抑制作用、体重減少作用、脂肪量増加抑制作用、摂食抑制作用などを有し、低毒性で安全な体重増加抑制剤、体重減少剤、脂肪量増加抑制剤、摂食抑制剤などとして使用できる。

一方、本発明のポリペプチドの活性や機能を阻害する化合物またはその塩は、例えば体重増加作用を有し、低毒性で安全な体重増加剤などとして有用である。

本発明のポリペプチドの活性や機能を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニングは、本発明のポリペプチドを用いるか、または組換え型本発明のポリペプチドの発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いる。このスクリーニングにより、本発明のポリペプチドとその受容体との結合性を変化させる化合物（本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物）（例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など）またはその塩もスクリーニングすることができる。このような化合物には、本発明の受容体を介して細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成／抑制、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内タンパク質の

- リン酸化、c-fosの活性化、pHの低下、GTP γ S結合活性などを促進する活性など）を有する化合物（即ち本発明の受容体アゴニスト）と該細胞刺激活性を有しない化合物（即ち本発明の受容体アンタゴニスト）などが含まれる。「本発明のポリペプチドとの結合性を変化させる」とは、本発明のポリペプチドとの結合を阻害する場合と本発明のポリペプチドとの結合を促進する場合の両方を包含するものである。

- 本発明のポリペプチドを用いることを特徴とする本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法の具体例としては、(i) 本発明の受容体またはその部分ペプチド（以下、これらを単に本発明の受容体と略称する場合がある）に、本発明のポリペプチドを接触させた場合と (i)
- 10 i) 上記した本発明の受容体に、本発明のポリペプチドおよび試験化合物を接触させた場合との比較を行なうことを特徴とする本発明のポリペプチドと本発明の受容体の結合性を変化させる化合物（本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物）またはその塩のスクリーニング方法が挙げられる。

- 15 上記スクリーニング方法においては、(i) 上記した本発明の受容体に、本発明のポリペプチドを接触させた場合と (ii) 上記した本発明の受容体に、本発明のポリペプチドおよび試験化合物を接触させた場合における、例えば該本発明の受容体に対するリガンドの結合量、細胞刺激活性などを測定して、比較する。

上記スクリーニング方法のさらなる具体例としては、

- 20 (a) 標識された本発明のポリペプチドを、上記した本発明の受容体に接触させた場合と、標識された本発明のポリペプチドおよび試験化合物を本発明の受容体に接触させた場合における、標識された本発明のポリペプチドの本発明の受容体に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする本発明のポリペプチドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物（本発明のポリペプチドの活性を促進
- 25 または阻害する化合物）またはその塩のスクリーニング方法、

(b) 標識された本発明のポリペプチドを、本発明の受容体を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合と、標識された本発明のポリペプチドおよび試験化合物を本発明の受容体を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識された本発明のポリペプチドの該細胞または該膜画分に対する

結合量を測定し、比較することを特徴とする本発明のポリペプチドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物（本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物）またはその塩のスクリーニング方法、

- (c) 標識された本発明のポリペプチドを、本発明の受容体をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明の受容体に接触させた場合と、標識された本発明のポリペプチドおよび試験化合物を本発明の受容体をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明のポリペプチドの受容体に接触させた場合における、標識された本発明のポリペプチドの本発明の受容体に対する結合量を測定し、比較
- 5 10 15 20 25
- することを特徴とする本発明のポリペプチドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物（本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物）またはその塩のスクリーニング方法、

- (d) 本発明の受容体を活性化する化合物（例えば、本発明のポリペプチド）を本発明の受容体を含有する細胞に接触させた場合と、本発明の受容体を活性化する化合物および試験化合物を本発明の受容体を含有する細胞に接触させた場合における、本発明の受容体を介した細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成／抑制、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内タンパク質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下、GTP γ S結合活性などを促進する活性
- 15 20 25
- または抑制する活性など）を測定し、比較することを特徴とする本発明のポリペプチドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物（本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物）またはその塩のスクリーニング方法、および

- (e) 本発明の受容体を活性化する化合物（例えば、本発明のポリペプチドなど）を本発明の受容体をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明の受容体に接触させた場合と、本発明の受容体を活性化する化合物および試験化合物を、本発明の受容体をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明の受容体に接触させた場合における、本発明の受容体を介する細胞刺激活性（例えば、アラ
- 25

キドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成／抑制、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内タンパク質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下、GTPγS結合活性などを促進する活性または抑制する活性など）を測定し、比較することを特徴とする本発明のポリペプチドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物（本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物）またはその塩のスクリーニング方法などである。

標識された本発明のポリペプチドの好ましい具体例は、放射性同位元素（例、 $[^{125}I]$ 、 $[^{131}I]$ 、 $[^3H]$ 、 $[^{14}C]$ など）、蛍光物質（例、シアニン蛍光色素（例、Cy2、Cy3、Cy5、Cy5.5、Cy7（アマシャムバイオサイエンス社製）など）、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなど）、酵素（例、β-ガラクトシダーゼ、β-グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素など）、発光物質（例、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなど）またはランタニド元素などでそれぞれ標識された配列番号：149、配列番号：16、配列番号：6、配列番号：17、配列番号：56、配列番号：57、配列番号：73、配列番号：74、配列番号：91または配列番号：92で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドなどが挙げられる。好ましくは $[^{125}I]$ で標識された配列番号：149で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドなどが挙げられる。

上記スクリーニング方法の具体的な説明を以下にする。

まず、本発明のスクリーニング方法に用いる本発明の受容体としては、本発明のポリペプチドをリガンドとして認識するものであれば何れのものであってもよいが、ヒトや温血動物の臓器の膜面分などが好適である。しかし、特にヒト由来の臓器は入手が極めて困難なことから、スクリーニングに用いられるものとしては、組換え体を用いて大量発現させた本発明の受容体などが適している。

本発明の受容体を製造するには、前述の本発明のポリペプチドの製造方法などが用いられる。

本発明のスクリーニング方法において、本発明の受容体を含有する細胞あるいは

は該細胞膜画分などを用いる場合、後述の調製法に従えばよい。

本発明の受容体を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法は公知の方法に従って行うことができる。

- 5 本発明の受容体を含有する細胞としては、本発明の受容体を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、前述の大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが挙げられる。また、本発明の受容体を発現した宿主細胞は、前述の本発明のポリペプチドを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体の製造方法と同様の方法などがあげられる。
- 10 膜画分としては、細胞を破碎した後、公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン（Kinematica社製）による破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などがあげられる。細胞膜の分画は、
- 15 分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速（500rpm～3000rpm）で短時間（通常、約1分～10分）遠心し、上清をさらに高速（15000rpm～30000rpm）で通常30分～2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現した本発明の受容体と細胞由来のリン脂質や膜タンパク
- 20 質などの膜成分が多く含まれる。
- 該本発明の受容体を含有する細胞や膜画分中の本発明の受容体の量は、1細胞当たり $10^3 \sim 10^8$ 分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$ 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性（比活性）が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロ
- 25 ットで大量の試料を測定できるようになる。

本発明のポリペプチドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物（本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物）をスクリーニングする前記の（a）～（c）を実施するためには、適当な本発明の受容体画分と、標識された本発明のポリペプチドなどが用いられる。本発明の受容体画分としては、天然

型の本発明の受容体画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型本発明の受容体画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性などを示す。標識されたポリペプチドとしては、例えば放射性同位元素（例、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{131}\text{I}]$ 、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ など）、蛍光物質（例、シアニン蛍光色素（例、Cy 2、Cy 3、Cy 5、Cy 5. 5、Cy 7（アマシャムバイオサイエンス社製）など）、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなど）、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなど）、酵素（例、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素など）、発光物質（例、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなど）またはランタニド元素などで標識されたポリペプチドなどが挙げられる。このうち好ましくは、 $[^{125}\text{I}]$ で標識されたポリペプチドである。

具体的には、本発明のポリペプチドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物のスクリーニングを行うには、まず本発明の受容体を含有する細胞または細胞の膜画分を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することによりレセプター標品を調製する。バッファーには、pH 4~10（望ましくはpH 6~8）のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどのリガンドとレセプターとの結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80TM（花王-アトラス社）、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによる本発明の受容体や本発明のポリペプチドの分解を抑える目的でPMSF、ロイペプチン、E-64（ペプチド研究所製）、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01ml~10mlの該レセプター溶液に、一定量（5000cpm~500000cpm）の標識された本発明のポリペプチドを添加し、同時に 10^{-10} ~ 10^{-7}M の試験化合物を共存させる。非特異的結合量（NSB）を知るために大過剰の未標識の本発明のポリペプチドを加えた反応チューブも用意する。反応は0℃から50℃、望ましくは4℃から37℃で20分から24時間、望ましくは30分から3時間行う。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後

- 、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターまたはγ-カウンターで計測する。拮抗する物質がない場合のカウント(B_0)から非特異的結合量(NSB)を引いたカウント($B_0 - \text{NSB}$)を100%とした時、特異的結合量($B - \text{NSB}$)が例えば50%以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

- 本発明のポリペプチドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物(本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物)をスクリーニングする前記の(d)～(e)の方法を実施するためには、本発明の受容体を介する細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成/抑制、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内タンパク質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下、GTPγS結合活性などを促進する活性または抑制する活性など)を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。具体的には、まず、本発明の受容体を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。スクリー
- 15 ニングを行うにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質(例えば、アラキドン酸など)の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

- 細胞刺激活性を測定してスクリーニングを行なうには、適当な本発明の受容体を発現した細胞が必要である。本発明の受容体を発現した細胞としては、前述の
- 25 本発明の受容体発現細胞株などが望ましい。

試験化合物としては、例えばペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などがあげられる。

本発明のポリペプチドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物(本発

明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物) またはその塩のスクリーニング用キットは、本発明の受容体またはその塩、本発明の受容体の部分ペプチドまたはその塩、本発明の受容体を含有する細胞、あるいは本発明の受容体を含有する細胞の膜画分、および本発明のポリペプチドを含有するものである。

5 本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

1. スクリーニング用試薬

(a) 測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製) に、0.05%のウシ血清アルブミン (シグマ社製) を加えたもの。

10 孔径0.45 μm のフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

(b) 本発明の受容体標品

本発明の受容体を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに 5×10^5 個/穴で継代し、37℃、5%CO₂、95%airで2日間培養したもの。

15 (c) 標識された本発明のポリペプチド

[³H]、[¹²⁵I]、[¹⁴C]、[³⁵S]などで標識された本発明のポリペプチドを適当な溶媒または緩衝液に溶解したものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて1 μM に希釈する。

(d) 本発明のポリペプチド標準液

20 本発明のポリペプチドを0.1%ウシ血清アルブミン (シグマ社製) を含むPBSで1mMとなるように溶解し、-20℃で保存する。

2. 測定法

(a) 12穴組織培養用プレートにて培養した本発明の受容体を発現させた細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490 μl の測定用緩衝液を各穴に加える。

25 (b) $10^{-3} \sim 10^{-10}$ Mの試験化合物溶液を5 μl 加えた後、標識された本発明のペプチドを5 μl 加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには試験化合物の代わりに 10^{-3} Mの本発明のポリペプチドを5 μl 加えておく。

(c) 反応液を除去し、1 ml の洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識された本発明のポリペプチドを0.2 N NaOH-1% SDSで溶解し、4 ml の液体シンチレーターA（和光純薬製）と混合する。

- (d) 液体シンチレーションカウンタ（ベックマン社製）を用いて放射活性を測定し、Percent Maximum Binding (PMB) を次の式〔数1〕で求める。

〔数1〕

$$\text{PMB} = [(B - \text{NSB}) / (B_0 - \text{NSB})] \times 100$$

PMB : Percent Maximum Binding

B : 検体を加えた時の値

- 10 NSB : Non-specific Binding (非特異的結合量)

B₀ : 最大結合量

- 上記スクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、本発明のポリペプチドと本発明の受容体との結合を変化させる（結合を阻害あるいは促進する）化合物（本発明のポリペプチドの活性を促進
- 15 または阻害する化合物）であり、具体的には本発明の受容体を介して細胞刺激活性を有する化合物またはその塩（いわゆる本発明の受容体アゴニスト）、あるいは該刺激活性を有しない化合物（いわゆる本発明の受容体アンタゴニスト）である。該化合物としては、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよい、
- 20 公知の化合物であってもよい。

上記本発明の受容体アゴニストであるかアンタゴニストであるかの具体的な評価方法は以下の（i）または（ii）に従えばよい。

- （i）前記（a）～（c）のスクリーニング方法で示されるバインディング・アッセイを行い、本発明のポリペプチドと本発明の受容体との結合性を変化させる（
- 25 特に、結合を阻害する）化合物を得た後、該化合物が上記した本発明の受容体を介する細胞刺激活性を有しているか否かを測定する。細胞刺激活性を有する化合物またはその塩は本発明の受容体アゴニストであり、該活性を有しない化合物またはその塩は本発明の受容体アンタゴニストである。

（ii）（a）試験化合物を本発明の受容体を含有する細胞に接触させ、上記本発明の

受容体を介した細胞刺激活性を測定する。細胞刺激活性を有する化合物またはその塩は本発明の受容体アゴニストである。

- (b) 本発明の受容体を活性化する化合物（例えば、本発明のポリペプチドまたは本発明の受容体アゴニストなど）を本発明の受容体を含有する細胞に接触させた場合と、本発明の受容体を活性化する化合物および試験化合物を本発明の受容体を含有する細胞に接触させた場合における、本発明の受容体を介した細胞刺激活性を測定し、比較する。本発明の受容体を活性化する化合物による細胞刺激活性を減少させ得る化合物またはその塩は本発明の受容体アンタゴニストである。
- 5

- 上記本発明の受容体アゴニストは、本発明の受容体に対する本発明のポリペプチドが有する生理活性と同様の作用を有しているので、本発明のポリペプチドと同様に体重増加抑制作用、体重減少作用、脂肪量増加抑制作用、摂食抑制作用などを有し、安全で低毒性な体重増加抑制剤、体重減少剤、脂肪量増加抑制剤、摂食抑制剤などとして使用することができる。
- 10

- 上記本発明の受容体アンタゴニストは、本発明の受容体に対する本発明のポリペプチドが有する生理活性を抑制することができるので、安全で低毒性な体重増加剤などとして使用することができる。
- 15

- 本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などから選ばれた化合物であり、本発明のポリペプチドの機能を促進または阻害する化合物である。
- 20

該化合物の塩としては、前記した本発明のポリペプチドの塩と同様のものを用いられる。

- 本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物を上述の治療・予防剤として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、前記した本発明のポリペプチドを含有する医薬と同様にし、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などとして行うことができる。
- 25

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは

温血動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、その作用、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、体重増加抑制の目的で本発明のポリペプチ

- 5 ドの活性・機能を促進する化合物を皮下投与する場合、一般的に成人（体重60 kg当たり）においては、一日につき該化合物を約0.1～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mg投与する。他の動物の場合も、60 kg当りに換算した量を投与することができる。

- 10 また、例えば、体重増加の目的で本発明のポリペプチドの活性・機能を阻害する化合物を皮下投与する場合、一般的に成人（体重60 kg当たり）においては、一日につき該化合物を約0.1～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mg投与する。他の動物の場合も、60 kg当りに換算した量を投与することができる。

（3）本発明のポリペプチドの定量

- 15 本発明のポリペプチドに対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）は、本発明のポリペプチドを特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のポリペプチドの定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。

すなわち、本発明は、

- 20 （i）本発明の抗体と、被検液および標識化された本発明のポリペプチドとを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された本発明のポリペプチドの割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明のポリペプチドの定量法、および
25 （ii）被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の別の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明のポリペプチドの定量法を提供する。

上記（ii）の定量法においては、一方の抗体が本発明のポリペプチドのN端部を認識する抗体で、他方の抗体が本発明のポリペプチドのC端部に反応する抗体であることが望ましい。

また、本発明のポリペプチドに対するモノクローナル抗体を用いて本発明のポリペプチドの定量を行うことができるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子の $F(a b')_2$ 、 $F a b'$ 、あるいは $F a b$ 画分を用いてもよい。

- 5 本発明の抗体を用いる本発明のポリペプチドの定量法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、ポリペプチド量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、
- 10 イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

- 標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質、ランタニド元素などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、 $[^{125}I]$ 、 $[^{131}I]$ 、 $[^3H]$ 、 $[^{14}C]$ などが用い
- 15 られる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。
- 20

- 抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常ポリペプチドあるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの
- 25 不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等があげられる。

サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ（1次反応）、さらに標識化した別の本発明のモノクローナル抗体を反応させ（2次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより

被検液中の本発明のポリペプチド量を定量することができる。1次反応と2次反応は逆の順序に行っても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。

- また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

- 本発明のサンドイッチ法による本発明のポリペプチドの測定法においては、1次反応と2次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体は、本発明のポリペプチドの結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。すなわち、1次反応および2次反応に用いられる抗体は、例えば、2次反応で用いられる抗体が、本発明のポリペプチドのC端部を認識する場合、1次反応で用いられる抗体は、好ましくはC端部以外、例えばN端部を認識する抗体が用いられる。

- 本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。

- 競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原(F)と、抗体と結合した標識抗原(B)とを分離し(B/F分離)、B、Fいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

- イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降

物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

これら個々の免疫学的測定法を本発明の定量方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件

- 5、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のポリペプチドの測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる。

- 例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「Methods in ENZYMOLOGY」Vol. 70(Immunochemical Techniques (Part A))、同書 Vol. 73(Immunochemical Techniques (Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques (Part C))、15 同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques (Part D : Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques (Part E : Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121(Immunochemical Techniques (Part I : Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (以上、アカデミックプレス社発行)などを参照することができる。

- 20 以上のようにして、本発明の抗体を用いることによって、本発明のポリペプチドを感度良く定量することができる。

- さらには、本発明の抗体を用いて本発明のポリペプチドの濃度を定量することによって、本発明のポリペプチドの濃度の減少が検出された場合、例えば、体重増加または脂肪量増加である、または将来体重が増加または脂肪量が増加する可能性が高いと診断することができる。

また、本発明のポリペプチドの濃度の増加が検出された場合には、例えば、体重減少などの疾病である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明のポリペ

プチドを検出するために使用することができる。また、本発明のポリペプチドを精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明のポリペプチドの検出、被検細胞内における本発明のポリペプチドの挙動の分析などのために使用することができる。

5 (4) 遺伝子診断薬

本発明のDNAは、例えば、プローブとして使用することにより、ヒトまたは温血動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、など）における本発明のポリペプチドをコードするDNAまたはmRNAの異常（遺伝子異常）を検出することができるので、
10 、例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断薬として有用である。

本発明のDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法（ゲノミックス（Genomics），第5巻，
15 874～879頁（1989年）、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ユーエスエー（Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America），第86巻，2766～2770頁（1989年））などにより実施することができる。

例えば、ノーザンハイブリダイゼーションにより発現低下が検出された場合は
20 、例えば、体重増加または脂肪量増加である可能性が高いまたは将来体重が増加または脂肪量が増加する可能性が高いと診断することができる。

また、ノーザンハイブリダイゼーションにより発現過多が検出された場合は、
例えば、体重減少などである可能性が高いまたは将来体重減少する可能性が高いと診断することができる。

25 (5) 本発明のアンチセンスDNAを含有する医薬

本発明のアンチセンスDNAは、本発明のポリペプチドまたは受容体の発現を抑制することができ、例えば、体重増加剤などとして使用することができる。

例えば、該アンチセンスDNAを用いる場合、該アンチセンスDNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソ

シエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って実施することができる。該アンチセンスDNAは、そのまま、あるいは摂取促進のために補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

- 5 さらに、該アンチセンスDNAは、組織や細胞における本発明のDNAの存在やその発現状況を調べるための診断用オリゴヌクレオチドプローブとして使用することもできる。

(6) 本発明の抗体を含有する医薬

- 10 本発明のポリペプチドを中和する作用を有する本発明の抗体は、例えば、体重増加剤などとして使用することができる。

- 15 本発明の抗体を含有する上記疾患の剤は、そのまま液剤として、または適当な剤型の医薬組成物として、ヒトまたは哺乳動物（例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して経口的または非経口的に投与することができる。投与量は、投与対象、対象疾患、症状、投与ルートなどによって異なるが、例えば、成人の体重増加抑制のために使用する場合には、本発明の抗体を1回量として、通常0.01~20mg/kg体重程度、好ましくは0.1~10mg/kg体重程度、さらに好ましくは0.1~5mg/kg体重程度を、1日1~5回程度、好ましくは1日1~3回程度、静脈注射により投与するのが好都合である。他の非経口投与および経口投与の場合もこれに準ずる量を投与することができる。症状が特に重い場合には、その症状に応じて増量してもよい。

- 20 本発明の抗体は、それ自体または適当な医薬組成物として投与することができる。上記投与に用いられる医薬組成物は、上記またはその塩と薬理学的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤とを含むものである。かかる組成物は、経口または非経口投与に適する剤形として提供される。

- 25 すなわち、例えば、経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤を含む）、シロップ剤、乳剤、懸濁剤などがあげられる。かかる組成物は公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有するものである。例えば、錠

剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、でんぷん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウムなどが用いられる。

非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤などが用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤などの剤形を包含する。かかる注射剤は、公知の方法に従って、例えば、上記抗体またはその塩を通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製する。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン界面活性剤〔例、ポリソルベート 80、HCO-50 (polyoxyethylene (50 mol) adduct of hydrogenated castor oil)〕などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどを併用してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。

15 直腸投与に用いられる坐剤は、上記抗体またはその塩を通常の坐薬用基剤に混合することによって調製される。

上記の経口用または非経口用医薬組成物は、活性成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されることが好都合である。かかる投薬単位の剤形としては、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤（アンプル）、坐剤などが例示され、それぞれの投薬単位剤形当たり通常 5～500 mg、とりわけ注射剤では 5～100 mg、その他の剤形では 10～250 mg の上記抗体が含有されていることが好ましい。

20

なお前記した各組成物は、上記抗体との配合により好ましくない相互作用を生じない限り他の活性成分を含有してもよい。

25 (7) DNA 転移動物

外来性の本発明のポリペプチドをコードする DNA（以下、本発明の外来性 DNA と略記する）またはその変異 DNA（本発明の外来性変異 DNA と略記する場合がある）を有する非ヒト哺乳動物も、体重増加抑制剤、体重減少剤、脂肪量増加抑制剤、摂食抑制剤などをスクリーニングするために用いられる。

本発明の外來性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物（以下、本発明のDNA転移動物と略記する）は、未受精卵、受精卵、精子およびその始原細胞を含む胚芽細胞などに対して、好ましくは、非ヒト哺乳動物の発生における胚発生の段階（さらに好ましくは、単細胞または受精卵細胞の段階でかつ一般に8細胞期以前）に、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェクション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、DEAE-デキストラン法などにより目的とするDNAを転移することによって作出することができる。また、該DNA転移方法により、体細胞、生体の臓器、組織細胞などに目的とする本発明の外來性DNAを転移し、細胞培養、組織培養などに利用することもでき、さらに、これら細胞を上述の胚芽細胞と公知の細胞融合法により融合させることにより本発明のDNA転移動物を作出することもできる。

非ヒト哺乳動物としては、例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、マウス、ラットなどが用いられる。なかでも、病体動物モデル系の作成の面から個体発生および生物サイクルが比較的短く、また、繁殖が容易なゲッ歯動物、とりわけマウス（例えば、純系として、C57BL/6系統、DBA2系統など、交雑系として、B6C3F₁系統、BDF₁系統、B6D2F₁系統、BALB/c系統、ICR系統など）またはラット（例えば、Wistar、SDなど）などが好ましい。

哺乳動物において発現しうる組換えベクターにおける「哺乳動物」としては、上記の非ヒト哺乳動物の他にヒトなどがあげられる。

本発明の外來性DNAとは、非ヒト哺乳動物が本来有している本発明のDNAではなく、いったん哺乳動物から単離・抽出された本発明のDNAをいう。

本発明の変異DNAとしては、元の本発明のDNAの塩基配列に変異（例えば、突然変異など）が生じたもの、具体的には、塩基の付加、欠損、他の塩基への置換などが生じたDNAなどが用いられ、また、異常DNAも含まれる。

該異常DNAとしては、異常な本発明のポリペプチドを発現させるDNAを意味し、例えば、正常な本発明のポリペプチドの機能を抑制するポリペプチドを発現させるDNAなどが用いられる。

本発明の外來性DNAは、対象とする動物と同種あるいは異種のどちらの哺乳

動物由来のものであってもよい。本発明のDNAを対象動物に転移させるにあたっては、該DNAを動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合したDNAコンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、本発明のヒトDNAを転移させる場合、これと相溶性が高い本発明のDNAを有する各種哺乳動物

5 物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のDNAを発現させうる各種プロモーターの下流に、本発明のヒトDNAを結合したDNAコンストラクト（例、ベクターなど）を対象哺乳動物の受精卵、例えば、マウス受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明のDNAを高発現するDNA転移哺乳動物を作出することができる。

- 10 本発明のポリペプチドの発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド、入ファージなどのバクテリオファージ、モロニー白血病ウィルスなどのレトロウィルス、ワクシニアウィルスまたはバキュロウィルスなどの動物ウィルスなどが用いられる。なかでも、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミドまたは酵母由来のプラスミドなどが
- 15 好ましく用いられる。

- 上記のDNA発現調節を行なうプロモーターとしては、例えば、(a) ウィルス（例、シミアンウィルス、サイトメガロウィルス、モロニー白血病ウィルス、JCウィルス、乳癌ウィルス、ポリオウィルスなど）に由来するDNAのプロモーター、(b) 各種哺乳動物（ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター
- 20 、ラット、マウスなど）由来のプロモーター、例えば、アルブミン、インスリンII、ウロプラキンII、エラスターゼ、エリスロポエチン、エンドセリン、筋クレアチンキナーゼ、グリア線維性酸性タンパク質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、血小板由来成長因子 β 、ケラチンK1、K10およびK14、コラーゲンI型およびII型、サイクリックAMP依存タンパク質キナーゼ β Iサブ
- 25 ユニット、ジストロフィン、酒石酸抵抗性アルカリフォスファターゼ、心房ナトリウム利尿性因子、内皮レセプターチロシンキナーゼ（一般にTie2と略される）、ナトリウムカリウムアデノシン3リン酸化酵素（Na, K-ATPase）、ニューロフィラメント軽鎖、メタロチオネインIおよびIIA、メタロプロティナーゼ1組織インヒビター、MHCクラスI抗原（H-2L）、H-ras

、レニン、ドーパミンβ-水酸化酵素、甲状腺ペルオキシダーゼ(TPO)、ポリペプチド鎖延長因子1α(EF-1α)、βアクチン、αおよびβミオシン重鎖、ミオシン軽鎖1および2、ミエリン基礎タンパク質、チログロブリン、Thy-1、免疫グロブリン、H鎖可変部(VNP)、血清アミロイドPコンポーネント、ミオグロビン、トロポニンC、平滑筋αアクチン、プレプロエンケファリンA、バソプレシンなどのプロモーターなどが用いられる。なかでも、全身で高発現することが可能なサイトメガロウイルスプロモーター、ヒトポリペプチド鎖延長因子1α(EF-1α)のプロモーター、ヒトおよびニワトリβアクチンプロモーターなどが好適である。

10 上記ベクターは、DNA転移哺乳動物において目的とするメッセンジャーRNAの転写を終結する配列(一般にターミネターと呼ばれる)を有していることが好ましく、例えば、ウイルス由来および各種哺乳動物由来の各DNAの配列を用いることができ、好ましくは、シミアンウイルスのSV40ターミネターなどが用いられる。

15 その他、目的とする外来性DNAをさらに高発現させる目的で各DNAのスプライシングシグナル、エンハンサー領域、真核DNAのイントロンの一部などをプロモーター領域の5'上流、プロモーター領域と翻訳領域間あるいは翻訳領域の3'下流に連結することも目的により可能である。

正常な本発明のポリペプチドの翻訳領域は、ヒトまたは各種哺乳動物(例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど)由来の20 肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来DNAおよび市販の各種ゲノムDNAライブラリーよりゲノムDNAの全てあるいは一部として、または肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来RNAより公知の方法により調製された相補DNAを原料として取得することが出来る。また、外来性の異常DNAは、上記の細胞25 または組織より得られた正常なポリペプチドの翻訳領域を点突然変異誘発法により変異した翻訳領域を作製することができる。

該翻訳領域は転移動物において発現しうるDNAコンストラクトとして、前記のプロモーターの下流および所望により転写終結部位の上流に連結させる通常のDNA工学的手法により作製することができる。

受精卵細胞段階における本発明の外來性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞のすべてに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において、本発明の外來性DNAが存在することは、作出動物の後代がすべて、その胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外來性DNAを保持
5 することを意味する。本発明の外來性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外來性DNAを有する。

本発明の外來性正常DNAを転移させた非ヒト哺乳動物は、交配により外來性DNAを安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。

10 受精卵細胞段階における本発明の外來性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに過剰に存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の外來性DNAが過剰に存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外來性DNAを過剰に有することを意味する。本発明の外來性DNAを受け継いだこの種の動物の
15 子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外來性DNAを過剰に有する。

導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを過剰に有するように繁殖継代することができる。

20 本発明の正常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の正常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を促進することにより最終的に本発明のポリペプチドの機能亢進症を発症することがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の正常DNA転移動物を用いて、本発明のポリペプチドの機能亢進症や、本発明のポリペプチドが関連する疾患の病態
25 機序の解明およびこれらの疾患の治療方法の検討を行なうことが可能である。

また、本発明の外來性正常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明のポリペプチドの増加症状を有することから、本発明のポリペプチドに関連する疾患に対する治療薬のスクリーニング試験にも利用可能である。

一方、本発明の外來性異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、交配により外來

性DNAを安定に保持することを確認して該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。さらに、目的とする外来DNAを前述のプラスミドに組み込んで原料として用いることができる。プロモーターとのDNAコンストラクトは、通常のDNA工学的手法によって作製することができる。受精卵細胞段階における本発明の異常DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の異常DNAが存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫は、その胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有する。導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。

本発明の異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の異常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を阻害することにより最終的に本発明のポリペプチドの機能不活性型不応症となることがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の異常DNA転移動物を用いて、本発明のポリペプチドの機能不活性型不応症の病態機序の解明およびこの疾患を治療方法の検討を行なうことが可能である。

また、具体的な利用可能性としては、本発明の異常DNA高発現動物は、本発明のポリペプチドの機能不活性型不応症における本発明の異常ポリペプチドによる正常ポリペプチドの機能阻害 (dominant negative作用) を解明するモデルとなる。

また、本発明の外来異常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明のポリペプチドの増加症状を有することから、本発明のポリペプチドまたはの機能不活性型不応症に対する治療薬スクリーニング試験にも利用可能である。

また、上記2種類の本発明のDNA転移動物のその他の利用可能性として、例えば、

(a) 組織培養のための細胞源としての使用、

(b) 本発明のDNA転移動物の組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するか

、またはDNAにより発現されたポリペプチド組織を分析することによる、本発明のポリペプチドにより特異的に発現あるいは活性化するポリペプチドとの関連性についての解析、

- (c) DNAを有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、一般に培養困難な組織からの細胞の機能の研究、

(d) 上記 (c) 記載の細胞を用いることによる細胞の機能を高めるような薬剤のスクリーニング、および

(e) 本発明の変異ポリペプチドを単離精製およびその抗体作製などが考えられる。

- 10 さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明のポリペプチドの機能不活性化型不応症などを含む、本発明のポリペプチドに関連する疾患の臨床症状を調べることができ、また、本発明のポリペプチドに関連する疾患モデルの各臓器におけるより詳細な病理学的所見が得られ、新しい治療方法の開発、さらには、該疾患による二次的疾患の研究および治療に貢献することができる。

- 15 また、本発明のDNA転移動物から各臓器を取り出し、細切後、トリプシンなどのタンパク質分解酵素により、遊離したDNA転移細胞の取得、その培養またはその培養細胞の系統化を行なうことが可能である。さらに、本発明のポリペプチド産生細胞の特定化、アポトーシス、分化あるいは増殖との関連性、またはそれらにおけるシグナル伝達機構を調べ、それらの異常を調べることなどができ、
- 20 本発明のポリペプチドおよびその作用解明のための有効な研究材料となる。

- さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明のポリペプチドの機能不活性化型不応症を含む、本発明のポリペプチドに関連する疾患の治療薬の開発を行なうために、上述の検査法および定量法などを用いて、有効で迅速な該疾患治療薬のスクリーニング法を提供することが可能となる。また、本発明のDNA転移動物または本発明の外来性DNA発現ベクターを用いて、本発明のポリペプチドが
- 25 関連する疾患のDNA治療法を検討、開発することが可能である。

(8) ノックアウト動物

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞および本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物も、体重増加抑制剤、体重減少剤、脂肪量増加抑制剤

、摂食抑制剤をスクリーニングするために用いられる。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞とは、該非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAに人為的に変異を加えることにより、DNAの発現能を抑制するか、もしくは該DNAがコードしている本発明のポリペプチドの活性を実質的に喪失させることにより、DNAが実質的に本発明のポリペプチドの発現能を有さない（以下、本発明のノックアウトDNAと称することがある）非ヒト哺乳動物の胚幹細胞（以下、ES細胞と略記する）をいう。

非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

本発明のDNAに人為的に変異を加える方法としては、例えば、遺伝子工学的手法により該DNA配列の一部又は全部の削除、他DNAを挿入または置換させることによって行なうことができる。これらの変異により、例えば、コドンの読み取り枠をずらしたり、プロモーターあるいはエキソンの機能を破壊することにより本発明のノックアウトDNAを作製すればよい。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞（以下、本発明のDNA不活性化ES細胞または本発明のノックアウトES細胞と略記する）の具体例としては、例えば、目的とする非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAを単離し、そのエキソン部分にネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子を代表とする薬剤耐性遺伝子、あるいはlacZ（β-ガラクトシダーゼ遺伝子）、cat（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子）を代表とするレポーター遺伝子等を挿入することによりエキソンの機能を破壊するか、あるいはエキソン間のイントロン部分に遺伝子の転写を終結させるDNA配列（例えば、ポリA付加シグナルなど）を挿入し、完全なメッセンジャーRNAを合成できなくすることによって、結果的に遺伝子を破壊するように構築したDNA配列を有するDNA鎖（以下、ターゲッティングベクターと略記する）を、例えば相同組換え法により該動物の染色体に導入し、得られたES細胞について本発明のDNA上あるいはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析あるいはターゲッティングベクター上のDNA配列とターゲッティングベクター作製に使用した本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列をプライマーとしたPCR法により解析し、本発明のノックアウトES細胞を選別

することにより得ることができる。

また、相同組換え法等により本発明のDNAを不活化させる元のES細胞としては、例えば、前述のような既に樹立されたものを用いてもよく、また公知のEvansとKaufmanの方法に準じて新しく樹立したものでもよい。例えば、マウスのES細胞の場合、現在、一般的には129系のES細胞が使用されているが、免疫学的背景がはっきりしていないので、これに代わる純系で免疫学的に遺伝的背景が明らかなES細胞を取得するなどの目的で例えば、C57BL/6マウスやC57BL/6の採卵数の少なさをDBA/2との交雑により改善したBDF₁マウス(C57BL/6とDBA/2とのF₁)を用いて樹立したものなども良好

5 S細胞の場合、現在、一般的には129系のES細胞が使用されているが、免疫学的背景がはっきりしていないので、これに代わる純系で免疫学的に遺伝的背景が明らかなES細胞を取得するなどの目的で例えば、C57BL/6マウスやC57BL/6の採卵数の少なさをDBA/2との交雑により改善したBDF₁マウス(C57BL/6とDBA/2とのF₁)を用いて樹立したものなども良好
10 に用いる。BDF₁マウスは、採卵数が多く、かつ、卵が丈夫であるという利点に加えて、C57BL/6マウスを背景に持つので、これを用いて得られたES細胞は病態モデルマウスを作出したとき、C57BL/6マウスとバッククロスすることでその遺伝的背景をC57BL/6マウスに代えることが可能である点で有利に用い得る。

15 また、ES細胞を樹立する場合、一般には受精後3、5日目の胚盤胞を使用するが、これ以外に8細胞期胚を採卵し胚盤胞まで培養して用いることにより効率よく多数の初期胚を取得することができる。

また、雌雄いずれのES細胞を用いてもよいが、通常雄のES細胞の方が生殖系列キメラを作出するのに都合が良い。また、煩雑な培養の手間を削減するため
20 にもできるだけ早く雌雄の判別を行なうことが望ましい。

ES細胞の雌雄の判定方法としては、例えば、PCR法によりY染色体上の性決定領域の遺伝子を増幅、検出する方法が、その1例としてあげることができる。この方法を使用すれば、従来、核型分析をするのに約10⁶個の細胞数を要していたのに対して、1コロニー程度のES細胞数(約50個)で済むので、培養
25 初期におけるES細胞の第一次セクションを雌雄の判別で行なうことが可能であり、早期に雄細胞の選定を可能にしたことにより培養初期の手間は大幅に削減できる。

また、第二次セクションとしては、例えば、G-バンディング法による染色体数の確認等により行うことができる。得られるES細胞の染色体数は正常数の

100%が望ましいが、樹立の際の物理的操作等の関係上困難な場合は、ES細胞の遺伝子をノックアウトした後、正常細胞（例えば、マウスでは染色体数が $2n=40$ である細胞）に再びクローニングすることが望ましい。

5 このようにして得られた胚幹細胞株は、通常その増殖性は大変良いが、個体発生できる能力を失いやすいので、注意深く継代培養することが必要である。例えば、STO繊維芽細胞のような適当なフィーダー細胞上でLIF（ $1-1000$ U/ml）存在下に炭酸ガス培養器内（好ましくは、5%炭酸ガス、95%空気または5%酸素、5%炭酸ガス、90%空気）で約37℃で培養するなどの方法で培養し、継代時には、例えば、トリプシン/EDTA溶液（通常0.001-
10 0.5%トリプシン/0.1-5mM EDTA、好ましくは約0.1%トリプシン/1mM EDTA）処理により単細胞化し、新たに用意したフィーダー細胞上に播種する方法などがとられる。このような継代は、通常1-3日毎に行なうが、この際に細胞の観察を行い、形態的に異常な細胞が見受けられた場合はその培養細胞は放棄することが望まれる。

15 ES細胞は、適当な条件により、高密度に至るまで単層培養するか、または細胞集塊を形成するまで浮遊培養することにより、頭頂筋、内臓筋、心筋などの種々のタイプの細胞に分化させることが可能であり [M. J. Evans及びM. H. Kaufman, ネイチャー (Nature) 第292巻、154頁、1981年; G. R. Martin プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.) 第78巻、7634頁、1981年; T. C. Doetschman
20 ら、ジャーナル・オブ・エンブリオロジー・アンド・エクスペリメンタル・モルフォロジー、第87巻、27頁、1985年]、本発明のES細胞を分化させて得られる本発明のDNA発現不全細胞は、インビトロにおける本発明のポリペプチドまたは本発明の受容体の細胞生物学的検討において有用である。

25 本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、該動物のmRNA量を公知方法を用いて測定して間接的にその発現量を比較することにより、正常動物と区別することが可能である。

該非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、例えば、前述のようにして作製し

たターゲッティングベクターをマウス胚幹細胞またはマウス卵細胞に導入し、導入によりターゲッティングベクターの本発明のDNAが不活性化されたDNA配列が遺伝子相同組換えにより、マウス胚幹細胞またはマウス卵細胞の染色体上の本発明のDNAと入れ換わる相同組換えをさせることにより、本発明のDNAを

5 ノックアウトさせることができる。

本発明のDNAがノックアウトされた細胞は、本発明のDNA上またはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析またはターゲッティングベクター上のDNA配列と、ターゲッティングベクターに使用したマウス由来の本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列とをプライマーとした

10 PCR法による解析で判定することができる。非ヒト哺乳動物胚幹細胞を用いた場合は、遺伝子相同組換えにより、本発明のDNAが不活性化された細胞株をクローニングし、その細胞を適当な時期、例えば、8細胞期の非ヒト哺乳動物胚または胚盤胞に注入し、作製したキメラ胚を偽妊娠させた該非ヒト哺乳動物の子宮に移植する。作出された動物は正常な本発明のDNA座をもつ細胞と人為的に変

15 異した本発明のDNA座をもつ細胞との両者から構成されるキメラ動物である。

該キメラ動物の生殖細胞の一部が変異した本発明のDNA座をもつ場合、このようなキメラ個体と正常個体を交配することにより得られた個体群より、全ての組織が人為的に変異を加えた本発明のDNA座をもつ細胞で構成された個体を、例えば、コートカラーの判定等により選別することにより得られる。このように

20 して得られた個体は、通常、本発明のポリペプチドのヘテロ発現不全個体であり、本発明のポリペプチドまたは本発明の受容体のヘテロ発現不全個体同志を交配し、それらの産仔から本発明のポリペプチドまたは本発明の受容体のホモ発現不全個体を得ることができる。

卵細胞を使用する場合は、例えば、卵細胞核内にマイクロインジェクション法でDNA溶液を注入することによりターゲッティングベクターを染色体内に導入したトランスジェニック非ヒト哺乳動物を得ることができ、これらのトランスジェニック非ヒト哺乳動物に比べて、遺伝子相同組換えにより本発明のDNA座に変異のあるものを選択することにより得られる。

このようにして本発明のDNAがノックアウトされている個体は、交配により

得られた動物個体も該DNAがノックアウトされていることを確認して通常の飼育環境で飼育継代を行なうことができる。

さらに、生殖系列の取得および保持についても常法に従えばよい。すなわち、該不活化DNAの保有する雌雄の動物を交配することにより、該不活化DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得しうる。得られたホモザイゴート動物は、母親動物に対して、正常個体1、ホモザイゴート複数になるような状態で飼育することにより効率的に得ることができる。ヘテロザイゴート動物の雌雄を交配することにより、該不活化DNAを有するホモザイゴートおよびヘテロザイゴート動物を繁殖継代する。

- 10 本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を作出する上で、非常に有用である。

また、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のポリペプチドまたは本発明の受容体により誘導され得る種々の生物活性を欠失するため、本発明のポリペプチドまたは本発明の受容体の生物活性の不活性化を原因とする疾病のモデルとなり得るので、これらの疾病の原因究明及び治療法の検討に有用である。

- 15 (8 a) 本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニング方法

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニングに用いることができる。

すなわち、本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、該動物の変化を観察・測定することを特徴とする、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

- 25 該スクリーニング方法において用いられる本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものがあげられる。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などがあげられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であ

ってもよい。

具体的には、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を、試験化合物で処理し、無処理の対照動物と比較し、該動物の各器官、組織、疾病の症状などの変化を指標として試験化合物の治療・予防効果を試験することができる。

- 5 試験動物を試験化合物で処理する方法としては、例えば、経口投与、静脈注射などが用いられ、試験動物の症状、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。また、試験化合物の投与量は、投与方法、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。

- 10 例えば、体重増加抑制剤をスクリーニングする場合、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に糖負荷処置を行ない、糖負荷処置前または処置後に試験化合物を投与し、該動物の血糖値および体重変化などを経時的に測定する。

- 該スクリーニング方法において、試験動物に試験化合物を投与した場合、該試験動物の血糖値が約10%以上、好ましくは約30%以上、より好ましくは約50%以上低下した場合、該試験化合物を上記の疾患に対して治療・予防効果を有する化合物として選択することができる。
- 15

- 該スクリーニング方法を用いて得られる化合物は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のポリペプチドの欠損や損傷などによって引き起こされる疾患に対して治療・予防効果を有するので、該疾患に対する安全で低毒性な治療・予防剤などの医薬として使用することができる。さらに、上記スクリー
- 20 ニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

- 該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸など）や塩基（例、アルカリ金属など）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン
- 25 酸、臭化水素酸、硫酸など）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など）との塩などが用いられる。

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記

した本発明のポリペプチドを含有する医薬と同様にして製造することができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

- 5 該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、該化合物を皮下投与する場合、一般的に成人（体重60 kgとして）の患者においては、一日につき該化合物を約0.1～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などに
- 10 よっても異なるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物を注射剤の形で通常成人（60 kgとして）の拒食症患者に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kgあたりに換算した量を投与する
- 15 ことができる。

（8 b）本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物をスクリーニング方法

- 本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。
- 20

- 上記スクリーニング方法において、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記した本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物の中でも、本発明のDNAがレポーター遺伝子を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうるものが用いられる。
- 25

試験化合物としては、前記と同様のものがあげられる。

レポーター遺伝子としては、前記と同様のものが用いられ、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子（lacZ）、可溶性アルカリフォスファターゼ遺伝子またはルシフ

エラーゼ遺伝子などが好適である。

- 本発明のDNAをレポーター遺伝子で置換された本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物では、レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの支配下に存在するので、レポーター遺伝子がコードする物質の発現をトレースすることにより、プロモーターの活性を検出することができる。

- 例えば、本発明のポリペプチドをコードするDNA領域の一部を大腸菌由来のβ-ガラクトシダーゼ遺伝子 (lacZ) で置換している場合、本来、本発明のポリペプチドの発現する組織で、本発明のポリペプチドの代わりにβ-ガラクトシダーゼが発現する。従って、例えば、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-ガラクトピラノシド (X-gal) のようなβ-ガラクトシダーゼの基質となる試薬を用いて染色することにより、簡便に本発明のポリペプチドの動物生体内における発現状態を観察することができる。具体的には、本発明のポリペプチド欠損マウスまたはその組織切片をグルタルアルデヒドなどで固定し、リン酸緩衝生理食塩液 (PBS) で洗浄後、X-galを含む染色液で、室温または37℃付近で、約30分ないし1時間反応させた後、組織標本を1mM EDTA / PBS溶液で洗浄することによって、β-ガラクトシダーゼ反応を停止させ、呈色を観察すればよい。また、常法に従い、lacZをコードするmRNAを検出してもよい。

- 上記スクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物である。

- 該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸 (例、無機酸など) や塩基 (例、有機酸など) などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸 (例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など) との塩、あるいは有機酸 (例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など) との塩などが用いられる。

本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物またはその塩は、

本発明のポリペプチドの発現を促進し、該ポリペプチドの機能を促進することができるので、例えば、体重増加抑制剤、体重減少剤、脂肪量増加抑制剤、摂食抑制剤などとして使用することができる。

また、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物またはその塩は、本発明のポリペプチドの発現を阻害し、該ポリペプチドの機能を阻害することができるので、例えば体重増加剤などとして使用することができる。

さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のポリペプチドまたはその塩を含有する医薬と同様にして製造することができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）の患者においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物を注射剤の形で通常成人（60kgとして）の患者に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

一方、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）の患者においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物

の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物を注射剤の形で通常成人（60 kgとして）の患者に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg当りに換算した量を投与することができる。

このように、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩をスクリーニングする上で極めて有用であり、本発明のDNA発現不全に起因する各種疾患の原因究明または予防・治療薬の開発に大きく貢献することができる。

また、本発明のポリペプチドのプロモーター領域を含有するDNAを使って、その下流に種々のタンパクをコードする遺伝子を連結し、これを動物の卵細胞に注入していわゆるトランスジェニック動物（遺伝子移入動物）を作成すれば、特異的にそのポリペプチドを合成させ、その生体での作用を検討することも可能となる。さらに上記プロモーター部分に適当なレポータ遺伝子を結合させ、これが発現するような細胞株を樹立すれば、本発明のポリペプチドそのものの体内での産生能力を特異的に促進もしくは抑制する作用を持つ低分子化合物の探索系として使用できる。

本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IU PAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatureによる略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

DNA	: デオキシリボ核酸
cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
25 A	: アデニン
T	: チミン
G	: グアニン
C	: シトシン
I	: イノシン

77

	R	: アデニン (A) またはグアニン (G)
	Y	: チミン (T) またはシトシン (C)
	M	: アデニン (A) またはシトシン (C)
	K	: グアニン (G) またはチミン (T)
5	S	: グアニン (G) またはシトシン (C)
	W	: アデニン (A) またはチミン (T)
	B	: グアニン (G) 、 グアニン (G) またはチミン (T)
	D	: アデニン (A) 、 グアニン (G) またはチミン (T)
	V	: アデニン (A) 、 グアニン (G) またはシトシン (C)
10	N	: アデニン (A) 、 グアニン (G) 、 シトシン (C) もしくはチミン (T) または不明もしくは他の塩基
	RNA	: リボ核酸
	mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
	dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
15	dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
	dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
	dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
	ATP	: アデノシン三リン酸
	EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
20	SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム
	BHA	: ベンズヒドリルアミン
	pMBHA	: p-メチルベンズヒドリルアミン
	Tos	: p-トルエンスルフォニル
	Bz l	: ベンジル
25	Bom	: ベンジルオキシメチル
	Boc	: t-ブチルオキシカルボニル
	DCM	: ジクロロメタン
	HOBT	: 1-ヒドロキシベンズトリアゾール
	DCC	: N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド

	TFA	: トリフルオロ酢酸
	DiEA	: ジイソプロピルエチルアミン
	BSA	: ウシ血清アルブミン
	CHAPS	: 3-〔(3-コラミドプロピル) ジメチルアンモニオ〕-
5		1-プロパンスホナート
	Gly又はG	: グリシン
	Ala又はA	: アラニン
	Val又はV	: バリン
	Leu又はL	: ロイシン
10	Ile又はI	: イソロイシン
	Ser又はS	: セリン
	Thr又はT	: スレオニン
	Cys又はC	: システイン
	Met又はM	: メチオニン
15	Glu又はE	: グルタミン酸
	Asp又はD	: アスパラギン酸
	Lys又はK	: リジン
	Arg又はR	: アルギニン
	His又はH	: ヒスチジン
20	Phe又はF	: フェニルアラニン
	Tyr又はY	: チロシン
	Trp又はW	: トリプトファン
	Pro又はP	: プロリン
	Asn又はN	: アスパラギン
25	Gln又はQ	: グルタミン
	pGlu	: ピログルタミン酸
	Tyr (I)	: 3-ヨードチロシン
	DMF	: N,N-ジメチルホルムアミド
	Fmoc	: N-9-フルオレニルメトキシカルボニル

- Trt : トリチル
- Pbf : 2, 2, 4, 6, 7-ペンタメチルジヒドロベンゾフラン
-5-スルホニル
- Clt : 2-クロロトリチル
- 5 Bu^t : t-ブチル
- Met (O) : メチオニンスルフォキシド

本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

〔配列番号：1〕

- 10 ヒトGPR8タンパク質をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：2〕

ヒトGPR8タンパク質をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNAの塩基配列を示す。

- 15 〔配列番号：3〕

5'側に制限酵素ClaIの認識する塩基配列が付加され、また3'側に制限酵素SpeIの認識する塩基配列が付加されたヒトGPR8タンパク質cDNAの全塩基配列を示す。

〔配列番号：4〕

- 20 ヒトGPR8タンパク質の全アミノ酸配列を示す。

〔配列番号：5〕

GPR8発現CHO細胞株の各クローンにおけるGPR8タンパク質mRNAの発現量を測定するために使用したriboprobeの配列を示す。

〔配列番号：6〕

- 25 ブタ視床下部から精製されたGPR8に対するリガンドペプチドのアミノ末端アミノ酸配列解析の結果から得られたアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：7〕

相補鎖がGPR8リガンドペプチドのヒトホモログの前駆体タンパク質の一部をコードしていると推定されるEST配列（アクセッション番号：AW007531）を示す。

す。

〔配列番号：8〕

相補鎖がGPR8リガンドペプチドのヒトホモログの前駆体タンパク質の一部をコードしていると推定されるEST配列（アクセッション番号：AI500303）を示す。

5

〔配列番号：9〕

相補鎖がGPR8リガンドペプチドのヒトホモログの前駆体タンパク質の一部をコードしていると推定されるEST配列（アクセッション番号：AI990964）を示す。

10 〔配列番号：10〕

相補鎖がGPR8リガンドペプチドのヒトホモログの前駆体タンパク質の一部をコードしていると推定されるEST配列（アクセッション番号：AA744804）を示す。

〔配列番号：11〕

15 GPR8リガンドペプチドのラットホモログの前駆体タンパク質の一部をコードしていると推定されるEST配列（アクセッション番号：H31598）を示す。

〔配列番号：12〕

GPR8に対するリガンドペプチドのヒトホモログの前駆体タンパク質の一部をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNAの塩基配列を示す。

20 〔配列番号：13〕

GPR8に対するリガンドペプチドのヒトホモログの前駆体タンパク質の一部をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：14〕

25 ヒト脳由来cDNAから増幅されたGPR8に対するリガンドペプチドのヒトホモログの前駆体タンパク質の一部をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：15〕

GPR8に対するリガンドペプチドのヒトホモログの前駆体タンパク質の一部のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：16〕

配列番号：15から推定されたGPR8に対するリガンドペプチドのヒトホモログのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：17〕

配列番号：15から推定されたGPR8に対するリガンドペプチドのヒトホモログのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：18〕

配列番号：16で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：19〕

配列番号：17で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

10 〔配列番号：20〕

後述の参考例14で合成されたヒトGPR8リガンド（1-29）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：21〕

15 後述の参考例15で合成されたヒトGPR8リガンド（1-28）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：22〕

後述の参考例16で合成されたヒトGPR8リガンド（1-27）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：23〕

20 後述の参考例17で合成されたヒトGPR8リガンド（1-26）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：24〕

後述の参考例18で合成されたヒトGPR8リガンド（1-25）のアミノ酸配列を示す。

25 〔配列番号：25〕

後述の参考例19で合成されたヒトGPR8リガンド（1-24）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：26〕

配列番号：20で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：27〕

配列番号：21で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：28〕

配列番号：22で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

5 〔配列番号：29〕

配列番号：23で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：30〕

配列番号：24で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：31〕

10 配列番号：25で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：32〕

配列番号：4で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：33〕

15 GPR8に対するリガンドペプチドのヒトホモログの前駆体タンパク質をコードするcDNAの5'上流側配列を得るのに使用した合成DNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：34〕

20 GPR8に対するリガンドペプチドのヒトホモログの前駆体タンパク質をコードするcDNAの5'上流側配列を得るのに使用した合成DNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：35〕

GPR8に対するリガンドペプチドのヒトホモログの前駆体タンパク質をコードするcDNAの5'上流側DNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：36〕

25 GPR8に対するリガンドペプチドのヒトホモログの前駆体タンパク質をコードするcDNAの3'下流側配列を得るのに使用した合成DNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：37〕

GPR8に対するリガンドペプチドのヒトホモログの前駆体タンパク質をコード

するcDNAの3'下流側配列を得るのに使用した合成DNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：38〕

GPR8に対するリガンドペプチドのヒトホモログの前駆体タンパク質をコード

- 5 するcDNAの3'下流側DNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：39〕

GPR8に対するリガンドペプチドのヒトホモログの前駆体タンパク質をコード

するcDNAを得るのに使用した合成DNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：40〕

- 10 GPR8に対するリガンドペプチドのヒトホモログの前駆体タンパク質をコード

するcDNAを得るのに使用した合成DNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：41〕

GPR8に対するリガンドペプチドのヒトホモログの前駆体タンパク質をコード

するcDNAの配列を示す。

- 15 〔配列番号：42〕

GPR8に対するリガンドペプチドのヒトホモログの前駆体タンパク質のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：43〕

GPR8に対するリガンドペプチドのブタホモログの前駆体タンパク質をコード

- 20 するcDNAの5'上流側配列を得るのに使用した合成DNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：44〕

GPR8に対するリガンドペプチドのブタホモログの前駆体タンパク質をコード

するcDNAの5'上流側配列を得るのに使用した合成DNAの塩基配列を示す

- 25 。

〔配列番号：45〕

GPR8に対するリガンドペプチドのブタホモログの前駆体タンパク質をコード

するcDNAの5'上流側DNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：46〕

GPR 8に対するリガンドペプチドのブタホモログの前駆体タンパク質をコードするcDNAの5'上流側配列を得るのに使用した合成DNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：47〕

5. GPR 8に対するリガンドペプチドのブタホモログの前駆体タンパク質をコードするcDNAの5'上流側配列を得るのに使用した合成DNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：48〕

- GPR 8に対するリガンドペプチドのブタホモログの前駆体タンパク質をコードするcDNAの5'上流側DNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：49〕

GPR 8に対するリガンドペプチドのブタホモログの前駆体タンパク質をコードするcDNAの3'下流側配列を得るのに使用した合成DNAの塩基配列を示す。

15. 〔配列番号：50〕

GPR 8に対するリガンドペプチドのブタホモログの前駆体タンパク質をコードするcDNAの3'下流側配列を得るのに使用した合成DNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：51〕

20. GPR 8に対するリガンドペプチドのブタホモログの前駆体タンパク質をコードするcDNAの3'下流側DNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：52〕

GPR 8に対するリガンドペプチドのブタホモログの前駆体タンパク質をコードするcDNAを得るのに使用した合成DNAの塩基配列を示す。

25. 〔配列番号：53〕

GPR 8に対するリガンドペプチドのブタホモログの前駆体タンパク質をコードするcDNAを得るのに使用した合成DNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：54〕

GPR 8に対するリガンドペプチドのブタホモログの前駆体タンパク質をコード

するcDNAの配列を示す。

〔配列番号：55〕

GPR8に対するリガンドペプチドのブタホモログの前駆体タンパク質のアミノ酸配列を示す。

5 〔配列番号：56〕

配列番号：55から推定されたGPR8に対するリガンドペプチドのブタホモログのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：57〕

配列番号：55から推定されたGPR8に対するリガンドペプチドのブタホモログのアミノ酸配列を示す。

10 〔配列番号：58〕

〔配列番号：58〕

配列番号：56で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：59〕

配列番号：57で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

15 〔配列番号：60〕

GPR8に対するリガンドペプチドのラットホモログの前駆体タンパク質の一部をコードするcDNAを得るのに使用した合成DNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：61〕

GPR8に対するリガンドペプチドのラットホモログの前駆体タンパク質の一部をコードするcDNAを得るのに使用した合成DNAの塩基配列を示す。

20 〔配列番号：62〕

〔配列番号：62〕

GPR8に対するリガンドペプチドのラットホモログの前駆体タンパク質の一部をコードするcDNAの配列を示す。

〔配列番号：63〕

25 GPR8に対するリガンドペプチドのラットホモログの前駆体タンパク質をコードするcDNAの5'上流側配列を得るのに使用した合成DNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：64〕

GPR8に対するリガンドペプチドのラットホモログの前駆体タンパク質をコー

ドするcDNAの5'上流側配列を得るのに使用した合成DNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：65〕

GPR8に対するリガンドペプチドのラットホモログの前駆体タンパク質をコード

- 5 ドするcDNAの5'上流側DNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：66〕

GPR8に対するリガンドペプチドのラットホモログの前駆体タンパク質をコード

ドするcDNAの3'下流側配列を得るのに使用した合成DNAの塩基配列を示す。

- 10 〔配列番号：67〕

GPR8に対するリガンドペプチドのラットホモログの前駆体タンパク質をコード

ドするcDNAの3'下流側配列を得るのに使用した合成DNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：68〕

- 15 GPR8に対するリガンドペプチドのラットホモログの前駆体タンパク質をコード

ドするcDNAの3'下流側DNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：69〕

GPR8に対するリガンドペプチドのラットホモログの前駆体タンパク質をコード

ドするcDNAを得るのに使用した合成DNAの塩基配列を示す。

- 20 〔配列番号：70〕

GPR8に対するリガンドペプチドのラットホモログの前駆体タンパク質をコード

ドするcDNAを得るのに使用した合成DNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：71〕

GPR8に対するリガンドペプチドのラットホモログの前駆体タンパク質をコード

- 25 ドするcDNAの配列を示す。

〔配列番号：72〕

GPR8に対するリガンドペプチドのラットホモログの前駆体タンパク質のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：73〕

配列番号：72から推定されたGPR8に対するリガンドペプチドのラットホモログのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：74〕

配列番号：72から推定されたGPR8に対するリガンドペプチドのラットホモ
5 ログのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：75〕

配列番号：73で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：76〕

配列番号：74で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

10 〔配列番号：77〕

ヒトGPR7発現CHO細胞のGPR7遺伝子発現量を測定するのにプローブとして用いた合成DNAの配列を示す。

〔配列番号：78〕

GPR8に対するリガンドペプチドのマウスホモログの前駆体タンパク質の一部
15 をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：79〕

GPR8に対するリガンドペプチドのマウスホモログの前駆体タンパク質の一部
をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNAの塩基配列を示す
20 。

〔配列番号：80〕

マウス精巣由来cDNAから増幅されたGPR8に対するリガンドペプチドのヒトホモログの前駆体タンパク質の一部をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：81〕

25 GPR8に対するリガンドペプチドのマウスホモログの前駆体タンパク質をコードするcDNAの5'上流側配列を得るのに使用した合成DNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：82〕

GPR8に対するリガンドペプチドのマウスホモログの前駆体タンパク質をコー

ドするcDNAの5'上流側配列を得るのに使用した合成DNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：83〕

- GPR8に対するリガンドペプチドのマウスホモログの前駆体タンパク質をコードするcDNAの5'上流側DNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：84〕

GPR8に対するリガンドペプチドのマウスホモログの前駆体タンパク質をコードするcDNAの3'下流側配列を得るのに使用した合成DNAの塩基配列を示す。

- 10 〔配列番号：85〕

GPR8に対するリガンドペプチドのマウスホモログの前駆体タンパク質をコードするcDNAの3'下流側配列を得るのに使用した合成DNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：86〕

- 15 GPR8に対するリガンドペプチドのマウスホモログの前駆体タンパク質をコードするcDNAの3'下流側DNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：87〕

GPR8に対するリガンドペプチドのマウスホモログの前駆体タンパク質をコードするcDNAを得るのに使用した合成DNAの塩基配列を示す。

- 20 〔配列番号：88〕

GPR8に対するリガンドペプチドのマウスホモログの前駆体タンパク質をコードするcDNAを得るのに使用した合成DNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：89〕

- 25 GPR8に対するリガンドペプチドのマウスホモログの前駆体タンパク質をコードするcDNAの配列を示す。

〔配列番号：90〕

GPR8に対するリガンドペプチドのマウスホモログの前駆体タンパク質のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：91〕

配列番号：90から推定されたGPR8に対するリガンドペプチドのマウスホモログのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：92〕

配列番号：90から推定されたGPR8に対するリガンドペプチドのマウスホモ

- 5 ログのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：93〕

配列番号：91で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：94〕

配列番号：92で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

- 10 〔配列番号：95〕

後述の参考例44で合成されたヒトGPR8リガンド（1-23）酸化体のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：96〕

後述の参考例45で合成されたヒトGPR8リガンド（1-22）のアミノ酸配

- 15 列を示す。

〔配列番号：97〕

後述の参考例46で合成されたヒトGPR8リガンド（1-21）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：98〕

- 20 後述の参考例47で合成されたヒトGPR8リガンド（1-20）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：99〕

後述の参考例48で合成されたヒトGPR8リガンド（1-19）のアミノ酸配列を示す。

- 25 〔配列番号：100〕

後述の参考例49で合成されたヒトGPR8リガンド（1-18）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：101〕

後述の参考例50で合成されたヒトGPR8リガンド（1-17）のアミノ酸配

列を示す。

〔配列番号：102〕

後述の参考例51で合成されたヒトGPR8リガンド（1-16）のアミノ酸配列を示す。

5 〔配列番号：103〕

後述の参考例54で合成されたGPR8リガンド（1-23）酸化体のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：104〕

10 後述の参考例55で合成されたラットあるいはマウスGPR8リガンド（1-23）酸化体のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：105〕

後述の参考例12で合成されたFmoc化ヒトGPR8リガンド（1-23）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：106〕

15 後述の参考例56で合成された [N^α-Acetyl-Trp]-ヒトGPR8リガンド（1-23）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：107〕

後述の参考例57で合成されたヒトGPR8リガンド（2-23）のアミノ酸配列を示す。

20 〔配列番号：108〕

後述の参考例58で合成されたヒトGPR8リガンド（4-23）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：109〕

25 後述の参考例59で合成されたヒトGPR8リガンド（9-23）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：110〕

後述の参考例60で合成されたヒトGPR8リガンド（15-23）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：111〕

後述の参考例 6 1 で合成された [N-Acetyl-Tyr²]-ヒト G P R 8 リガンド (2-2 3) のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：1 1 2〕

- 5 後述の参考例 6 2 で合成された [D-Trp¹]-ヒト G P R 8 リガンド (1-2 3) のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：1 1 3〕

後述の参考例 6 3 で合成された [N-3-Indolepropanoyl-Tyr²]-ヒト G P R 8 リガンド (2-2 3) のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：1 1 4〕

- 10 配列番号：9 6 で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：1 1 5〕

配列番号：9 7 で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：1 1 6〕

配列番号：9 8 で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

- 15 〔配列番号：1 1 7〕

配列番号：9 9 で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：1 1 8〕

配列番号：1 0 0 で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：1 1 9〕

- 20 配列番号：1 0 1 で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：1 2 0〕

配列番号：1 0 2 で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：1 2 1〕

配列番号：1 0 7 で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

- 25 〔配列番号：1 2 2〕

配列番号：1 0 8 で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：1 2 3〕

配列番号：1 0 9 で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：1 2 4〕

配列番号：110で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：125〕

配列番号：6で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：126〕

- 5 本発明のラット由来新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質TGR26のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：127〕

本発明のラット由来新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質TGR26をコードするcDNAの塩基配列を示す。

- 10 〔配列番号：128〕

以下の参考例67におけるPCR反応で使用したプライマー1の塩基配列を示す。

〔配列番号：129〕

以下の参考例67におけるPCR反応で使用したプライマー2の塩基配列を示す。

15

〔配列番号：130〕

以下の参考例68におけるTGR26発現CHO細胞のTGR26レセプター遺伝子発現量を測定するのに使用したプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：131〕

- 20 以下の参考例68におけるTGR26発現CHO細胞のTGR26遺伝子発現量を測定するのに使用したプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：132〕

以下の参考例75におけるPCR反応で使用したプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：133〕

- 25 以下の参考例75におけるPCR反応で使用したプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：134〕

以下の参考例75で得られたマウスTGR26をコードするDNAの5'上流端部分の塩基配列を示す。

〔配列番号：135〕

以下の参考例 24 における PCR 反応で使用したプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：136〕

以下の参考例 24 における PCR 反応で使用したプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：137〕

- 5 以下の参考例 24 で得られたマウス TGR 26 をコードする cDNA の塩基配列を示す。

〔配列番号：138〕

マウス由来 TGR 26 のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：139〕

- 10 マウス由来 TGR 26 をコードする cDNA の塩基配列を示す。

〔配列番号：140〕

以下の参考例 68 における TGR 26 発現 CHO 細胞の TGR 26 遺伝子発現量を測定するのに使用したプローブの塩基配列を示す。

〔配列番号：141〕

- 15 ヒト GPR 7 をコードする cDNA のスクリーニングに使用した合成 DNA の塩基配列を示す。

〔配列番号：142〕

ヒト GPR 7 をコードする cDNA のスクリーニングに使用した合成 DNA の塩基配列を示す。

- 20 〔配列番号：143〕

5' 側に制限酵素 Cla I の認識する塩基配列が付加され、また 3' 側に制限酵素 Spe I の認識する塩基配列が付加されたヒト GPR 7 タンパク質 cDNA の全塩基配列を示す。

〔配列番号：144〕

- 25 ヒト GPR 7 の全アミノ酸配列を示す。

〔配列番号：145〕

標準ヒト GPR 7 DNA を増幅するのにプライマーとして使用した DNA 塩基配列を示す。

〔配列番号：146〕

標準ヒトGPR7 DNAを増幅するのにプライマーとして使用したDNA塩基配列を示す。

〔配列番号：147〕

- ヒトGPR7発現CHO細胞のGPR7遺伝子発現量を測定するのにプライマーとして用いた合成DNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：148〕

ヒトGPR7発現CHO細胞のGPR7遺伝子発現量を測定するのにプライマーとして用いた合成DNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：149〕

- 10 [Phe²]ヒトGPR8リガンド(1-20)のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：150〕

配列番号：149で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

- 後述の参考例3で得られた形質転換体*Escherichia coli* DH5 α /pAKKO-GPR8は、
- 15 大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号(郵便番号532-8686)、財団法人発酵研究所(IFO)に2001年2月27日から寄託番号IFO 16564として、茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6(郵便番号305-8566)、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに2001年4月11日から受託番号FERM BP-7540として、それぞれ寄託
- 20 されている。

- 後述の参考例28で得られた形質転換体*Escherichia coli* TOP10/pCR2.1-TOPO Human GPR8 Ligand Precursorは、大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号(郵便番号532-8686)、財団法人発酵研究所(IFO)に2001年2月27日から寄託番号IFO 16568として、茨城県つくば市東1丁目
- 25 1番地1 中央第6(郵便番号305-8566)、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに2001年4月11日から受託番号FERM BP-7544として、それぞれ寄託されている。

後述の参考例32で得られた形質転換体*Escherichia coli* TOP10/pCR2.1-TOPO Porcine GPR8 Ligand Precursorは、大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番

85号(郵便番号532-8686)、財団法人発酵研究所(IFO)に2001年2月27日から寄託番号IFO 16565として、茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6(郵便番号305-8566)、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに2001年4月11日から受託番号FERM

5 BP-7541として、それぞれ寄託されている。

後述の参考例36で得られた形質転換体*Escherichia coli* TOP10/pCR2.1-TOPO Rat GPR8 Ligand Precursorは、大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号(郵便番号532-8686)、財団法人発酵研究所(IFO)に2001年2月27日から寄託番号IFO 16567、茨城県つくば市東1丁目1番地1

10 中央第6(郵便番号305-8566)、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに2001年4月11日から受託番号FERM BP-7543として、それぞれ寄託されている。

後述の参考例41で得られた形質転換体*Escherichia coli* TOP10/pCR2.1-TOPO Mouse GPR8 Ligand Precursorは、大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番8

15 5号(郵便番号532-8686)、財団法人発酵研究所(IFO)に2001年2月27日から寄託番号IFO 16566として、茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6(郵便番号305-8566)、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに2001年4月11日から受託番号FERM BP-7542として、それぞれ寄託されている。

20 後述の参考例67で得られた形質転換体 大腸菌(*Escherichia coli*) DH10B/pAK-rGPR7は、2000年10月31日から大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号(郵便番号532-8686)、財団法人・発酵研究所(IFO)に受託番号IFO 16496として、2000年11月13日から茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6(郵便番号305-8566)
25 、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター(旧通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(NIBH))に受託番号FERM BP-7365としてそれぞれ寄託されている。

後述の参考例24で得られた形質転換体 大腸菌(*Escherichia coli*) TOP10/pCR2.1-TOPO Mouse GPR7は、2001年9月20日

から大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号（郵便番号532-8686）、財団法人・発酵研究所（IFO）に受託番号IFO 16704として、2001年10月15日から茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号305-8566）、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに受託番号FERM BP-7775としてそれぞれ寄託されている。

実施例

以下に参考例および実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

10

参考例1 ヒト脳由来cDNAを用いたPCR法によるヒトGPR8 cDNAの増幅

ヒト脳由来poly (A) ⁺RNA（クローンテック）を鋳型として、ランダムプライマーを用いて逆転写反応を行なった。逆転写は、タカラRNA PCR ver 2.1キット試薬
15 を使用した。次にこの逆転写生成物を鋳型として用い、配列番号：1および配列番号：2で表される合成プライマーを用いてPCR法による増幅を行なった。合成プライマーは受容体タンパク質に翻訳される領域の遺伝子が増幅されるように構築したが、その際に遺伝子の5'側に制限酵素C l a Iの認識する塩基配列が付加され、3'側に制限酵素S p e Iの認識する塩基配列が付加されるように、
20 5'側および3'側にそれぞれの制限酵素の認識配列を付加した。反応液の組成は、cDNA鋳型5 μ l、合成DNAプライマー各0.4 μ M、0.8mM dNTPs、P f u ポリメラーゼ（ストラタジーン）0.5 μ lおよび酵素に付属のバッファーで、総反応量は50 μ lとした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー（PE Biosystems）を用い、94℃・60秒の加熱の後、94℃・60秒、65℃・60秒、72℃・150秒のサイクルを35回繰り返した。増幅産物の確認は、0.8%アガロースゲル電気泳動の後、
25 エチジウムブロマイド染色によって行なった。

参考例2 PCR産物のプラスミドベクターへのサブクローニングおよび挿入cDNA部分の塩基配列の解読による増幅cDNA配列の確認

参考例1で行なったPCR反応液を0.8%の低融点アガロースゲル電気泳動により分離し、バンドの部分をかみそりで切り出した後、細片化、フェノール抽出、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿の操作を行なってDNAを回収した。PCR-Script™ Amp SK (+) クローニングキット (ストラタジーン) の処方
5 に従い、回収したDNAをプラスミドベクターpCR-Script Amp SK (+) ヘサブクローニングした。これをエシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) DH5 α competent cell (東洋紡) に導入して形質転換した後、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリン、IPTGおよびX-galを含むLB寒天培地で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌したつま楊枝を用いて分離し、形質転換体*E. coli* DH5
10 α /GPR8を得た。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、QIAwell 8 Plasmid Kit (キアゲン) を用いてプラスミドDNAを調製した。調製したDNAの一部に対して制限酵素C1aIおよびSpeIによる切断を行ない、挿入されている受容体cDNA断片の大きさを確認した。塩基配列の決定のための反応はDyeDeoxyTerminator Cycle Sequence Kit (PE Biosystems) を用いて行
15 ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読した (配列番号: 3)。ヒトGPR8受容体タンパク質cDNAの全塩基配列が配列番号: 3に、およびそれから翻訳されるヒトGPR8受容体タンパク質の全アミノ酸配列が配列番号: 4に示されている。

20 参考例3 GPR8発現CHO細胞の作製

参考例2で配列が確認されたヒト脳由来のGPR8の全長アミノ酸配列をコードし5'側にC1aI認識配列を付加し、また3'側にSpeI認識配列を付加した遺伝子が導入されたプラスミドによって形質転換された*E. coli*のクローンからPlasmid Midi Kit (キアゲン) を用いてプラスミドDNAを調製し、これを
25 制限酵素C1aIおよびSpeIで消化してインサートDNAを切り出した。インサートDNAは電気泳動後、アガロースゲルからカミソリで切り出し、次に細片化、フェノール抽出、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿の操作により回収された。このインサートDNAをC1aIおよびSpeIで切断した動物細胞発現用ベクタープラスミドpAKK0-111H (S. Hinuma et al., Biochim. B

iophys. Acta, 1219巻、251-259頁、1994年、記載のpAKK01.11Hと同一のベクタープラスミド)に加え、T4リガーゼ(宝酒造)を用いてライゲーションを行ない、タンパク質発現用プラスミドpAKK0-GPR8を構築した。このプラスミドpAKK0-GPR8で形質転換した大腸菌をDH5 α /pAKK0-GPR8 (*Escherichia coli* DH5 α /pAKK0-GPR8)と命名した。

pAKK0-GPR8で形質転換した*E. coli* DH5 α (東洋紡)を培養後、Plasmid Midi Kit (キアゲン)を用いてpAKK0-GPR8プラスミドDNAを調製した。これをCeliplect Transfection Kit (アマシャムファルマシアバイオテック)を用いて、添付のプロトコールに従ってCHO dhfr⁻細胞に導入した。4.5 μ gのDNAをリン酸カルシウムとの共沈懸濁液とし、24時間前に5 x 10⁵または1 x 10⁶個のCHO dhfr⁻細胞を播種した直径6 cmシャーレに添加した。10%ウシ胎児血清を含むMEM α 培地で1日間培養した後、継代し、選択培地である10%透析ウシ胎児血清を含む核酸不含MEM α 培地で培養した。選択培地中に増殖してくるGPR8発現CHO細胞である形質転換細胞のコロニー47クローンを選択した。

参考例4 全長ヒトGPR8タンパク質mRNAの発現量の高いCHO/GPR8細胞株の選択

参考例3で樹立されたCHO/GPR8細胞株47クローンの全長GPR8タンパク質mRNAの発現量をCytostar T Plate (アマシャムファルマシアバイオテック)を用い、添付のプロトコールに従って以下のように測定した。CHO/GPR8細胞株の各クローンをCytostar T Plateに1well当たり2.5 x 10⁴個ずつ播種して24時間培養した後、10%ホルマリンによって細胞を固定した。各wellに0.25% Triton X-100を添加して細胞の透過性をあげた後、³⁵Sラベルした配列番号: 5のriboprobeを加えてハイブリダイズさせた。20 μ g/mlのRNase Aを各wellに加えて遊離のriboprobeを消化し、プレートをよく洗浄した後、ハイブリダイズしたriboprobeの放射活性をTopcounterで測定した。放射活性の高い細胞株は、mRNA発現量が高い。mRNA発現量の高い3クローン(#17, 41および46)を以下に実験に用いたが、特にクローン番号17を用いた。

参考例5 GPR8発現CHO細胞を用いた細胞内cAMP産生量の測定

参考例4で作製したCHO/GPR8細胞およびmock CHO細胞を24穴プレートに 5×10^4 cell/wellで播種し、48時間培養した。細胞を0.2mM 3-イソブチルメチルキサンチンと0.05% BSAと20mM HEPESを含むハンクスバッファー(pH7.4)で洗浄した(以下、0.2mM 3-イソブチルメチルキサンチンと0.05% BSAと20mM HEPESを含むハンクスバッファー(pH7.4)を、反応用バッファーと呼ぶ)。その後0.5mlの反応用バッファーを加えて30分間培養器で保温した。反応用バッファーを除き、新たに0.25mlの反応用バッファーを細胞に加えた後、試料と2.5 μ Mフォルスコリンを含む0.25mlの反応用バッファーを細胞に加え、37℃で24分間反応させた。100 μ lの20%過塩素酸を加えて反応を停止させ、次に氷上で1時間置くことにより細胞内cAMPを抽出した。抽出液中のcAMP量は、cAMP EIAキット(アマシャムファルマシアバイオテク)を用いて測定した。

15 参考例6 GPR8発現CHO細胞の膜画分を用いたGTP γ S結合活性の測定

GPR8発現CHO細胞膜画分に対する $[^{35}\text{S}]$ -Guanosine 5'-(γ -thio) triphosphateの結合促進活性を以下の方法により測定した。最初に膜画分の調製法を記載する。1 $\times 10^8$ 個のCHO/GPR8細胞に10mlのホモジネートバッファー(10mM NaHCO₃, 5mM EDTA, 0.5mM PMSF, 1 μ g/ml pepstatin, 4 μ g/ml E64, 20 μ g/ml leupeptin)添加し、ポリトロン(12,000 rpm, 1分間)を用いて破碎した。細胞破碎液を遠心(1,000 g, 15分間)して上清を得た。次にこの上清を超遠心分離(Beckman type 30ローター, 30,000 rpm, 1時間)し、得られた沈殿物をGPR8発現CHO細胞膜画分とした。

GTP γ S結合活性の測定は以下の通りである。GPR8発現CHO細胞膜画分を膜希釈緩衝液(50mM トリス塩酸緩衝液(pH 7.4), 5mM MgCl₂, 150mM NaCl, 1 μ M GDP)で希釈して、タンパク質濃度30 mg/mlのアッセイ用細胞膜画分溶液を調製した。アッセイ用膜画分溶液200 μ lに、51.5nM濃度の $[^{35}\text{S}]$ -Guanosine 5'-(γ -thio) triphosphate(NEN社)を2 μ lと試料を添加し、この混合液を25℃で一時間保温した。混合液をフィルター濾過し、さらにフィルターを洗浄用バッファー

(50mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4), 5mM $MgCl_2$, 1mM EDTA, 0.1% BSA) 1.5ml で 2 回洗浄した後、フィルターの放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。

- 5 参考例 7 プタ視床下部抽出物に含まれ、CHO/GPR8 細胞株に対して特異的に cAMP 産生抑制および GTP γ S 結合促進を示す活性の検出

プタ視床下部抽出物の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) フラクションを以下に述べる方法で調製した。東京芝浦臓器 (株) より購入した、処理当日に屠殺して摘出後は氷冷保存したプタ視床下部 500 g (30 頭分) を細かく切断し、直

10 ぐに沸騰した蒸留水 2.0 l に投じて 10 分間煮沸した。煮沸後、直ちに氷冷し、120 ml の酢酸を加えて終濃度 1.0 M とし、ポリトロン (20,000 rpm、6 分間) を用いて破碎した。破碎液を遠心 (8,000 rpm、30 分) して上清を取り、沈殿には 1.0 M 酢酸 2.0 l を加えて再度ポリトロンによって破碎し、一晚攪拌した後、遠心 (8,000 rpm、30 分) して上清を得た。上清に 2 倍量の冷アセトンを 4℃ でゆっくり滴下し

15 た後、1 回目の遠心によって得た上清については一晚攪拌し、2 回目の遠心によって得た上清については 4 時間攪拌した。アセトンを加えた抽出液は遠心 (8,000 rpm、30 分) して沈殿を除き、得られた上清からエバポレーターによって減圧下にアセトンを溜去した。アセトンを除いた抽出液に等量のジエチルエーテルを加え、分液ロートを使って脂質を含むエーテル層を分離して水層を回収した。エー

20 テル脱脂した抽出液はエバポレーターによって減圧下に濃縮してエーテルを完全に除去した。濃縮液をガラス繊維濾紙 (アドバンテック、DP70 (90 mm ϕ)) で濾過し、濾液をガラス製カラム (30 ϕ x 240 mm) に充填した C18 (ワイエムシー、YMCgel ODS-AM 120-S50) カラムに添加した。カラムを 1.0 M 酢酸 400 ml で洗浄後、0.1% トリフルオロ酢酸を含む 60% アセトニトリル 500 ml で溶出した。溶出液を減

25 圧下に濃縮して溶媒を溜去した後、濃縮液を凍結乾燥した。凍結乾燥品約 0.5 g を 30 ml の 0.1% トリフルオロ酢酸を含む 10% アセトニトリルに溶解し、10 ml ずつを C18 カラム (トーソー、TSKgel ODS-80TS (21.5 ϕ x 300 mm)) を用いた 10% から 60% の 0.1% トリフルオロ酢酸を含むアセトニトリルの濃度勾配溶出法による HPLC にかけた。HPLC は 3 回行なった。溶出液は 60 分面に分取し、3 回分の

溶出液をまとめた。各分画を減圧下に濃縮・乾固し、残渣を0.5 mlのジメチルスルフォキシド (DMSO) で溶解した。

上記によって得られたHPLCフラクションのDMSO溶液を参考例5に示した方法によってCHO/GPR8細胞に投与し、細胞内cAMP産生量の測定を行った結果、分画番号30に顕著なcAMP産生抑制活性が認められた。また同様な試料についてGPR8発現CHO細胞用いてGTP γ S結合促進活性を調べたところ、やはり分画番号30付近に顕著な活性が確認された。これらの活性は他の受容体発現細胞では認められなかったことからブタ視床下部抽出物にGPR8特異的なリガンド活性物質が存在することが示された。

10

参考例8 ブタ視床下部抽出物中のGPR8発現CHO細胞に対して特異的に細胞内cAMP産生抑制活性を示す活性物質のプロナーゼによる失活

参考例7でGPR8発現CHO細胞に対して細胞内cAMP産生抑制活性を示したHPLC分画30をタンパク質分解酵素であるプロナーゼ (Sigma, protease Type XIV (P5147)) で処理し、活性物質が蛋白性であるかを調べた。

15

上記視床下部抽出物HPLC分画 (#30) 2 μ lを0.2 M酢酸アンモニウム200 μ lに加え、これにプロナーゼ3 μ gを添加して37℃で2時間インキュベートした後、沸騰水中で10分間加熱してプロナーゼを失活させた。これにBSA 0.05mgおよびHAPS 0.05 mgを含む蒸留水2 mlを加えてから凍結乾燥した。プロナーゼそのものあるいは加熱および凍結乾燥の影響を調べるため、プロナーゼのみ、HPLC分画のみおよびプロナーゼのみを加熱処理した後にHPLC分画を加えたものについても同様に処理して凍結乾燥した。凍結乾燥した各試料を参考例5に示す方法によってGPR8発現CHO細胞に添加して細胞内cAMP産生抑制活性を測定した。ブタ視床下部抽出物中のGPR8発現CHO細胞に対する細胞内cAMP産生抑制活性を示す活性物質はプロナーゼによって完全に失活したことからこの物質がタンパク質もしくはペプチドであることが示された。

20

25

参考例9 ブタ視床下部からのGPR8発現CHO細胞膜画分に対して特異的にGTP γ S結合促進活性を示す活性物質の精製

GPR 8に特異的なリガンド活性を示す物質をGPR 8発現CHO細胞膜画分に対するGTP γ S結合促進活性を指標としてブタ視床下部から精製した代表例を以下に具体的に述べる。参考例7に述べた方法と全く同一の方法により、ブタ視床下部500 g (30頭分) を1.0 M酢酸で抽出し、アセトン沈殿およびエーテル脱脂をした後、C18 (ワイエムシー、YMCgel ODS-AM 120-S50) カラムに吸着させ、0.1%トリフルオロ酢酸を含む60%アセトニトリルで溶出した。溶出液を濃縮し、凍結乾燥した後、C18カラム (トーソー、TSKgel ODS-80TS (21.5 ϕ x 300 mm)) を用いたHPLCによって活性分画を得た。活性は分画番号30に回収された。これを以下の方法によってさらに精製した。

- 10 この分画を10%アセトニトリルを含む10 mMギ酸アンモニウム10 mlに溶解し、陽イオン交換カラム (トーソー、TSKgel SP-5PW (20 mm ϕ x 150 mm)) に添加した後、10%アセトニトリルを含む10 mMから2.0 Mのギ酸アンモニウムの濃度勾配によってカラムを溶出した。活性はギ酸アンモニウム0.8 M付近に回収された。活性分画を凍結乾燥し、0.1%トリフルオロ酢酸を含む10%アセトニトリル1.0 ml
- 15 に溶解し、CNカラム (野村化学、Develosil CN-UG-5 (4.6 mm ϕ x 250 mm)) に添加した後、0.1%トリフルオロ酢酸を含む21%から26%のアセトニトリルの濃度勾配によって溶出した。活性はアセトニトリル22.1%付近に出現した。活性分画を凍結乾燥し、0.1 mlのDMSOで溶解し、さらに0.4 mlの0.1%トリフルオロ酢酸を含む10%アセトニトリルを加えてODSカラム (和光純薬、Wakosil-II 3C18HG (2.0
- 20 mm ϕ x 150 mm)) に添加した後、0.1%トリフルオロ酢酸を含む22.5%から32.5%のアセトニトリルの濃度勾配によって溶出した。活性はアセトニトリル26.5%付近に単一ピークとして出現した (図1)。

- 参考例10 ブタ視床下部から精製されたGPR 8発現CHO細胞膜画分に対して特異的にGTP γ S結合促進活性を示す活性物質のアミノ末端アミノ酸配列の解析およびGPR 8リガンドのヒトおよびラットホモログペプチドの前駆体タンパク質の一部をコードしていると推定されるEST配列
- 25

参考例9で精製されたGPR 8発現CHO細胞膜画分に対して特異的にGTP γ S結合促進活性を示す活性物質のアミノ末端アミノ酸配列解析を行なった。本

活性物質は参考例 8 に示すようにタンパク質またはペプチドであることが推定されていたので、活性ピークを含む溶出液を用いてパーキンエルマー社 Procise 494 Protein Sequencer によってアミノ末端アミノ酸配列分析を行なった。その結果、アミノ末端から 17 残基までに配列番号：6 に示す配列が得られた。この配列はリガンドペプチドの一部であると考えられた。

この配列に基づいて遺伝子データベースの検索を行なったところ、そのものもしくはその相補鎖がこのペプチドの前駆体タンパク質の一部をコードしていると推定される幾つかの E S T (Expressed Sequence Tag) 配列が見出された。それらのアクセッション番号、cDNA の由来、配列の長さおよび配列番号は次の通りである。AW007531 (anaplastic oligodendroglioma、438 base、配列番号：7)、AI500303 (anaplastic oligodendroglioma、264 base、配列番号：8)、AI990964 (colonic mucosa from patient of Crohn's disease、424 base、配列番号：9)、AA744804 (germinal center B cell、375 base、配列番号：10)、H31598 (PC12 cells、260 base、配列番号：11)。初めの 4 つはヒト由来であり、最後の 1 つはラット由来である。これらの E S T の DNA 配列はブタ視床下部より単離した活性ペプチドの配列に相当するアミノ酸配列をコードする領域では極めてよく一致してしており、また翻訳されたアミノ酸配列はブタ視床下部より単離され明らかとなったペプチドの配列とは 5 残基目の Thr が Val であること以外はほぼ一致した。以上からこれらの E S T は GPR 8 のリガンドペプチドのヒトおよびラットホモログの前駆体タンパク質の一部をコードしているものと推定した。

参考例 1.1 GPR 8 リガンドペプチド前駆体の一部をコードするヒト cDNA の増幅と増幅 cDNA 配列の解読

参考例 1.0 に述べた GPR 8 リガンドペプチドの前駆体タンパク質の一部をコードすると推定された E S T 配列に基づいてプライマーを設計し、ヒト脳由来 cDNA より PCR によって GPR 8 リガンドペプチド前駆体の一部をコードする cDNA を増幅した。

ヒト脳由来 poly (A) +RNA (クローンテック) を鋳型として、ランダムプライマーを用いて逆転写反応を行なった。逆転写反応には、RNase H 活性を欠失させた M

MLV由来の逆転写酵素であるReverTra Ace (東洋紡) を使用した。続いて参考例10に述べたEST配列に基づいて設計した配列番号: 12および配列番号: 13の合成DNAプライマーを用いてPCR法による増幅を行なった。反応液の組成は、cDNA鋳型2 μ l、合成DNAプライマー各0.5 μ M、1.6mM dNTPs、LA Taq (宝酒造) 0.2 μ lおよび酵素に付属のバッファーで、総反応量は20 μ lとした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー (PE Biosystems) を用い、96 $^{\circ}$ C・120秒の加熱の後、96 $^{\circ}$ C・30秒、72 $^{\circ}$ C・45秒のサイクルを4回、96 $^{\circ}$ C・30秒、70 $^{\circ}$ C・45秒のサイクルを4回、96 $^{\circ}$ C・30秒、68 $^{\circ}$ C・45秒のサイクルを4回、96 $^{\circ}$ C・30秒、64 $^{\circ}$ C・30秒、72 $^{\circ}$ C・45秒のサイクルを5回、96 $^{\circ}$ C・30秒、60 $^{\circ}$ C・30秒、72 $^{\circ}$ C・45秒のサイクルを20回繰り返し、最後に72 $^{\circ}$ Cで10分間保温した。増幅産物の確認は、3%アガロースゲル電気泳動の後、エチジウムブロマイド染色によって行なった。

PCR反応液を3%の低融点アガロースゲル電気泳動により分離し、バンドの部分をかみそりで切り出した後、QIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン) を用いてDNAを回収した。TOPO TAクローニングキット (インビトロゲン) の処方に従い、回収したDNAをプラスミドベクターpCR2.1-TOPOへサブクローニングした。これをEscherichia coli TOP10 (インビトロゲン) に導入して形質転換した後、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリンおよびX-galを含むLB寒天培地で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌したつま楊枝を用いて分離し、形質転換体を得た。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、QIAwell 8 Plasmid Kit (キアゲン) を用いてプラスミドDNAを調製した。塩基配列の決定のための反応はDyeDeoxyTerminator Cycle Sequence Kit (PE Biosystems) を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読し、配列番号: 14に示すDNA配列を得た。このこの配列から翻訳されるGPR8リガンドペプチド前駆体タンパク質の一部 (配列番号: 15) には予想どおりブタ視床下部より単離されて配列が明らかになった活性ペプチドに相当するペプチド配列が存在した。さらに、そのC末側には通常の生理活性ペプチドが切り出されると考えられるArg-Argの配列 (Seidah, N. G. et al., Ann. N. Y. Acad. Sci., 839巻、9-24頁、1998年) が2ヶ所存在した。このことから、GPR8のリガンドペプチドのヒトホモログのアミノ酸配列は配列番号: 16および17のいずれ

かもしくは両方であると推定された。

参考例 1 2 Fmoc化ヒトGPR8 ligand (1-23) : Fmoc-Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu (配列番号 : 1 0 5) およびヒトGPR8 ligand (1-23) : Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu (配列番号 : 1 6) の製造

市販 2-chlorotrityl resin (Clt resin, 1.33mmol/g) にFmoc-Leu を導入した Fmoc-Leu-O-Clt resin (0.76mmol/g) 0.25mmol を出発原料とし、ペプチド合成機 BI 433A を用い Fmoc/ DCC/ HOBt法により、Fmoc-Gly, Fmoc-Met, Fmoc-Leu, Fmoc-Leu, Fmoc-Gly, Fmoc-Ala, Fmoc-Ala, Fmoc-Arg (Pbf), Fmoc-Gly, Fmoc-Val, Fmoc-Thr (Bu^t), Fmoc-His (Trt), Fmoc-Tyr (Bu^t), Fmoc-Arg (Pbf), Fmoc-Pro, Fmoc-Ser (Bu^t), Fmoc-Ala, Fmoc-Val, Fmoc-His (Trt), Fmoc-Lys (Boc), Fmoc-Tyr (Bu^t), Fmoc-Trp (Boc) の順に縮合を行い、Fmoc-Trp (Boc)-Tyr (Bu^t)-Lys (Boc)-His (Trt)-Val-Ala-Ser (Bu^t)-Pro-Arg (Pbf)-Tyr (Bu^t)-His (Trt)-Thr (Bu^t)-Val-Gly-Arg (Pbf)-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu-O-Clt resin 830 mg を得た。この樹脂150mgに TFA / thioanisole / m-cresol / triisopropylsilane / ethanedithiol (85 / 5 / 5 / 2.5 / 2.5) 5 ml を加え、室温にて 2時間振盪した後樹脂をろ去し、溶媒を濃縮後エーテルを加え、粗 Fmoc-Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu を沈殿として得た。これを YMC D-ODS-5-ST S-5 120A カラム (20 x 150mm) を用いた分取HPLCで、A液: 0.1%TFA-水、B液: 0.1%TFA含有アセトニトリルによるA/B : 72/28~52/48への直線型濃度勾配溶出 (60分) を行い、目的物を含む分画を集め凍結乾燥し白色粉末9.7mgを得た。

質量分析による (M+H)⁺ 2805.7 (計算値2805.4)

HPLC溶出時間 25.1 分

溶出条件

カラム Wakosil-II 5C18 HG (4.6 x 100mm)

溶離液 A液: 0.1%TFA-水、B液: 0.1%TFA含有アセトニトリルを用い、A/B: 1

00 / 0 ~ 30 / 70へ 直線型濃度勾配溶出 (35分)

- 流速 1.0ml/分 得られた Fmoc-Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu 5 mg に 20% diethylamine / DMF 1 mL を加え室温にて 2 時間攪拌した。溶媒を留去後 YMC D-ODS-5-ST S-5 120A カラム (20 x 150mm) を用いた分取 HPLC で、A液: 0.1%TFA-水、B液: 0.1%TFA含有アセトニトリルによる A/B: 74/26 ~ 64/36 への直線型濃度勾配溶出 (60分) を行い、目的物を含む分画を集め凍結乾燥し白色粉末 1.2mg を得た。
- 質量分析による (M+H)⁺ 2583.6 (計算値 2583.4)
- HPLC 溶出時間 20.4 分

10 溶出条件

カラム Wakosil-II 5C18 HG (4.6 x 100mm)

溶離液 A液: 0.1%TFA-水、B液: 0.1%TFA含有アセトニトリルを用い、A/B: 100 / 0 ~ 30 / 70へ 直線型濃度勾配溶出 (35分)

流速 1.0ml/分

15

参考例 13 ヒト GPR8 ligand (1-30): Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu-Arg-Arg-Ser-Pro-Tyr-Leu-Trp (配列番号: 17) の製造

- 市販 2-chlorotriethyl resin (Clt resin, 1.33mmol/g) に Fmoc-Trp (Boc) を導入した Fmoc-Trp (Boc)-O-Clt resin (0.64mmol/g) 0.25mmol を出発原料として参考例 12 と同様に配列順通りにアミノ酸を縮合、最後の Trp を導入後樹脂から切り出す前に Fmoc 基を樹脂上で除去したのち、TFA / thioanisole / m-cresol / triisopropylsilane / ethanedithiol (85 / 5 / 5 / 2.5 / 2.5) で処理し樹脂からの切り出しと側鎖保護基の除去を同時に行った。粗ペプチドを参考例 12 と同様の方法で精製し Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu-Arg-Arg-Ser-Pro-Tyr-Leu-Trp を得た。
- 質量分析による (M+H)⁺ 3543.4 (計算値 3544.2)
- HPLC 溶出時間 21.5 分
- 溶出条件

カラム Wakosil-II 5C18 HG (4.6 x 100mm)

溶離液 A液: 0.1%TFA-水、B液: 0.1%TFA含有アセトニトリルを用い、 A/B: 100 / 0 ~ 30 / 70へ 直線型濃度勾配溶出 (35分)

流速 1.0ml/分

5

参考例 1 4 ヒトGPR8 ligand (1-29) : Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu-Arg-Arg-Ser-Pro-Tyr-Leu (配列番号 : 2 0) の製造

- 参考例 1 2 の樹脂を用い参考例 1 3 と同様に配列順にアミノ酸を縮合したのち
- 10 樹脂からの切り出しと精製を行いTrp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu-Arg-Arg-Ser-Pro-Tyr-Leuを得る。

- 参考例 1 5 ヒトGPR8 ligand (1-28) : Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu-Arg-Arg-Ser-Pro-Tyr (配列番号 : 2 1) の製造
- 15

- 市販 2-chlorotrityl resin (Clt resin, 1.33mmol/g) にFmoc-Tyr (Bu^t) を導入したのち参考例 1 3 と同様に配列順にアミノ酸の縮合と樹脂からの切り出し、精製を行いTrp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu-Arg-Arg-Ser-Pro-Tyrを得る。
- 20

- 参考例 1 6 ヒトGPR8 ligand (1-27) : Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu-Arg-Arg-Ser-Pro (配列番号 : 2 2) の製造
- 25

市販 2-chlorotrityl resin (Clt resin, 1.33mmol/g) にFmoc-Proを導入したのち参考例 1 3 と同様に配列順にアミノ酸の縮合と樹脂からの切り出し、精製を行いTrp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu-Arg-Arg-Ser-Proを得る。

参考例 17 ヒトGPR8 ligand (1-26) : Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu-Arg-Arg-Ser(配列番号 : 23) の製造

- 市販 2-chlorotrityl resin (Clt resin, 1.33mmol/g) にFmoc-Ser(Bu^t)を導入したのち参考例 13と同様に配列順にアミノ酸の縮合と樹脂からの切り出し、精製を行いTrp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu-Arg-Arg-Serを得る。

- 参考例 18 ヒトGPR8 ligand (1-25) : Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu-Arg-Arg(配列番号 : 24) の製造

- 市販 2-chlorotrityl resin (Clt resin, 1.33mmol/g) にFmoc-Arg(Pbf)を導入したのち参考例 13と同様に配列順にアミノ酸の縮合と樹脂からの切り出し、精製を行いTrp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu-Arg-Argを得る。

参考例 19 ヒトGPR8 ligand (1-24) : Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu-Arg(配列番号 : 25) の製造

- 市販 2-chlorotrityl resin (Clt resin, 1.33mmol/g) にFmoc-Arg(Pbf)を導入したのち参考例 13と同様に配列順にアミノ酸の縮合と樹脂からの切り出し、精製を行いTrp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu-Argを得る。

- 参考例 20 GPR8発現CHO細胞膜画分を用いて測定した23残基のGPR8リガンドペプチドのヒトホモログのGTP γ S結合促進活性

参考例 12で合成した23残基のGPR8リガンドペプチドのヒトホモログ(以下、hGPR8L(1-23)と記載することがある)を種々の濃度で参考例6に記載した方法でGPR8発現CHO細胞膜画分に投与してGTP γ S結合促進活性を測定し

た。結果を図2に示した。明らかにhGPR8L(1-23)は濃度依存的にGPR8発現CHO細胞膜画分のGTP γ S結合を促進した。このことから配列番号:16の構造を有するペプチドがGPR8に対するリガンドであることが明らかとなった。

- 5 参考例21 GPR8発現CHO細胞膜画分を用いて測定した30残基のGPR8リガンドペプチドのヒトホモログのGTP γ S結合促進活性

参考例13で合成した30残基のGPR8リガンドペプチドのヒトホモログ(以下、hGPR8L(1-30)と記載することがある)を種々の濃度で参考例6に記載した方法でGPR8発現CHO細胞膜画分に投与してGTP γ S結合促進活性を測定した。結果を図3に示した。明らかにhGPR8L(1-30)は濃度依存的にGPR8発現CHO細胞膜画分のGTP γ S結合を促進した。このことから配列番号:17の構造を有するペプチドがGPR8に対するリガンドであることが明らかとなった。

- 15 参考例22 GPR8発現CHO細胞を用いて測定した23残基のGPR8リガンドペプチドのヒトホモログの細胞内cAMP産生抑制活性

参考例12で合成したhGPR8L(1-23)を種々の濃度で参考例5に記載した方法でGPR8発現CHO細胞に接触させて細胞内cAMP産生抑制活性を測定した。結果を図4に示した。明らかにhGPR8L(1-23)は濃度依存的にGPR8発現CHO細胞に対して細胞内cAMPの産生を抑制した。図中、cAMP合成抑制活性は、フォルスコリンを含む反応用バッファーを添加したときの細胞内cAMP量から反応用バッファーを添加したときの細胞内cAMP量を減じた量を100%として、hGPR8L(1-23)を加えたときの細胞内cAMP量から反応用バッファーを添加したときの細胞内cAMP量を減じた量を%として表わした。

- 25 参考例23 GPR8発現CHO細胞を用いて測定した30残基のGPR8リガンドペプチドのヒトホモログの細胞内cAMP産生抑制活性

参考例13で合成したhGPR8L(1-30)を種々の濃度で参考例5に記載した方法でGPR8発現CHO細胞に接触させて細胞内cAMP産生抑制活性を測定した。結果を図5に示した。明らかにhGPR8L(1-30)は濃度依存的にGPR8発現CHO

細胞に対して細胞内 cAMP の産生を抑制した。図 5 中、cAMP 合成抑制活性は、フォルスコリンを含む反応用バッファーを添加したときの細胞内 cAMP 量から反応用バッファーを添加したときの細胞内 cAMP 量を減じた量を 100% として、hGPR8L (1-30) を加えたときの細胞内 cAMP 量から反応用バッファーを添加したときの細胞内 cAMP 量を減じた量を%として表わした。

参考例 24 マウス TGR26 をコードする cDNA のクローニング

マウス脳 cDNA を鋳型として配列番号: 135 の合成プライマーと配列番号: 136 の合成プライマーを用いた PCR 法によりマウス TGR26 DNA の増幅を行なった。

反応液の組成は、マウス脳 cDNA 1 μ l、合成プライマー各 0.2 μ M、0.8 mM dNTPs、Advantage cDNA Polymerase Mix (CLONTECH) 0.4 μ l および酵素に付属のバッファーで、総反応量を 20 μ l とした。サーマルサイクラー (Applied Biosystems 社) を用い、96℃で2分の加熱した後、96℃で30秒、64℃で30秒、72℃で1分の加熱サイクルを30回繰り返し、最後に72℃で10分間保温した。PCR 反応液中の約 1100 塩基長の増幅 DNA 断片を、TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) のプロトコルに従い、pCR 2.1-TOPO へクローニングした。これをエシェリヒア・コリ (Escherichia coli) TOP10 competent cell (Invitrogen) に導入して形質転換した後、cDNA 挿入断片を持つクローンをアンピシリンおよび X-gal を含む LB 寒天培地で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌したつま楊枝を用いて分離し、形質転換体を得た。個々のクローンをアンピシリンを含む LB 培地で一晚培養し、QIAwell 8 Plasmid Kit (キアゲン) を用いてプラスミド DNA を調製した。塩基配列の決定のための反応は BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE バイオシステムズ) を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読し、配列番号: 137 で表される塩基配列を得た。

配列番号: 137 で表される塩基配列をアミノ酸配列に翻訳したものをマウス TGR26 アミノ酸配列とし、配列番号: 138 として示す。

配列番号: 138 をラット由来の TGR26 のアミノ酸配列と比較したところ

、96.0%のアミノ酸の一致が認められた。

配列番号：137で表される塩基配列を有するDNAを含むプラスミドで形質転換した大腸菌を、大腸菌 (*Escherichia coli*) TOP10/pCR2.1-TOPOマウスGPR7と命名した。

5

参考例25 ヒトGPR8リガンド前駆体タンパク質をコードするcDNAの5'上流端のクローニング

参考例11に記載したGPR8のリガンドペプチドのヒトホモログ（以下、ヒトGPR8リガンドと記載することがある）の前駆体タンパク質の一部をコードするヒトcDNA配列（配列番号：14）を基に作製したプライマーでヒト視床下部cDNAを鋳型とした5' RACE PCRを行ない、ヒトGPR8リガンド前駆体タンパク質をコードするcDNAの5'上流塩基配列を明らかにした。5' RACE PCR クローニングは、ヒト視床下部Marathon-Ready cDNA (CLONTECH)を鋳型としてキットに添付のAP1プライマーと配列番号：33の合成プライマーでPCR反応を行ない、次にこのPCR反応液を鋳型としてキットに添付のAP2プライマーと配列番号：34の合成プライマーでPCR反応を行なうことにより達成された。PCRの反応液組成と反応条件は以下のとおりである。反応液はヒト視床下部cDNA 4 μ l、AP1プライマー0.5 μ M、配列番号：33の合成DNAプライマー0.5 μ M、0.4 mM dNTPs、LATAqポリメラーゼ（宝酒造）0.2 μ lおよび酵素に付属のGC（I）バッファーで総反応量を20 μ lとし、サーマルサイクラー（PE Biosystems）を用い、96℃・120秒の加熱の後、96℃・30秒、68℃・240秒のサイクルを30回繰り返し、さらに72℃で10分間保温した。次に、キットに添付のTricine-EDTA Bufferで50倍希釈したPCR反応液2 μ l、AP2プライマー0.5 μ M、配列番号：34の合成DNAプライマー0.5 μ M、0.4 mM dNTPs、LATAqポリメラーゼ（宝酒造）0.2 μ lおよび酵素に付属のGC（I）バッファーで総反応量を20 μ lとし、サーマルサイクラー（PE Biosystems）を用い、96℃・120秒の加熱の後、96℃・30秒、72℃・180秒のサイクルを4回、次に96℃・30秒、70℃・180秒のサイクルを4回、次に96℃・30秒、68℃・180秒のサイクルを17回、最後に72℃で10分間保温した。増幅したDNAを1.2%のアガロースゲル電気泳動により分離し

- た後、約1,200塩基長のDNAをカミソリで切り出し、DNAをQIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン) を用いて回収した。このDNAを、TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) のプロトコールに従ってpCR2.1-TOPOベクターへクローニングした。これをエシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) TOP10 competent cell (Invitrogen) に導入して形質転換した後、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリンおよびX-galを含むLB寒天培地で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌したつま楊枝を用いて分離し、形質転換体を得た。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、QIAwell 8 Plasmid Kit (キアゲン) を用いてプラスミドDNAを調製した。塩基配列の決定のための反応はBigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Biosystems) を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読し、配列番号: 35に示すDNA配列を得た。

参考例26 ヒト脳cDNAの作製

- 15 ヒト脳cDNAは、Marathon™ cDNA Amplification Kit (CLONTECH) を用いてヒト脳poly A(+) RNA (CLONTECH) から作製した。RACE PCRに供されるcDNAは1st strand cDNA合成を除き、キットに添付のプロトコールに従って作製した。1st strand cDNAは、キットに添付の逆転写酵素AMVの代わりに逆転写酵素MLV (-RNase H) (RevTraAce, 東洋紡) を用いて、1μgのヒト脳poly A(+) RNA
20 から合成した。

参考例27 ヒトGPR8リガンド前駆体タンパク質をコードするcDNAの3' 下流端のクローニング

- 参考例11に記載のヒトGPR8リガンド前駆体タンパク質の一部をコードするヒトcDNA配列(配列番号: 14)を基に作製したプライマーでヒト脳cDNAを鋳型とした3' RACE PCRを行ない、ヒトGPR8リガンドをコードするcDNAの3' 下流塩基配列を明らかにした。3' RACE PCR クローニングは、ヒト脳 cDNAを鋳型としてキットに添付のAP1プライマーと配列番号: 36の合成プライマーでPCR反応を行ない、次にこのPCR反応液を鋳型としてキット

- に添付のAP 2 プライマーと配列番号：37の合成プライマーでPCR反応を行なうことにより達成された。PCRの反応液組成と反応条件は以下のとおりである。反応液はキットに添付のTricine-EDTA Bufferで50倍希釈したヒト脳cDNA 1 μ l、AP 1 プライマー0.5 μ M、配列番号：36の合成DNAプライマー0.5 μ M、0.4 mM dNTPs、LATAqポリメラーゼ（宝酒造）0.2 μ lおよび酵素に付属のGC（I）バッファーで総反応量を20 μ lとし、サーマルサイクラー（PE Biosystems）を用い、96 $^{\circ}$ C・120秒の加熱の後、96 $^{\circ}$ C・30秒、68 $^{\circ}$ C・240秒のサイクルを30回繰り返す、さらに72 $^{\circ}$ Cで10分間保温した。次に、キットに添付のTricine-EDTA Bufferで50倍希釈したPCR反応液1 μ l、AP 2 プライマー0.5 μ M、配列番号：37の合成DNAプライマー0.5 μ M、0.4 mM dNTPs、LATAqポリメラーゼ（宝酒造）0.2 μ lおよび酵素に付属のGC（I）バッファーで総反応量を20 μ lとし、サーマルサイクラー（PE Biosystems）を用い、96 $^{\circ}$ C・120秒の加熱の後、96 $^{\circ}$ C・30秒、72 $^{\circ}$ C・180秒のサイクルを4回、次に96 $^{\circ}$ C・30秒、70 $^{\circ}$ C・180秒のサイクルを4回、次に96 $^{\circ}$ C・30秒、68 $^{\circ}$ C・180秒のサイクルを17回、最後に72 $^{\circ}$ Cで10分間保温した。増幅したDNAを1.5%のアガロースゲル電気泳動により分離した後、約600塩基長のDNAをカミソリで切り出し、DNAをQIAquick Gel Extraction Kit（キアゲン）を用いて回収した。このDNAを、TOPO TA Cloning Kit（Invitrogen）のプロトコールに従ってpCR2.1-TOPOベクターへクローニングした。これをエシェリヒア コリ（*Escherichia coli*）TOP10 competent cell（Invitrogen）に導入して形質転換した後、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリンおよびX-galを含むLB寒天培地で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌したつま楊枝を用いて分離し、形質転換体を得た。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、QIAwell 8 Plasmid Kit（キアゲン）を用いてプラスミドDNAを調製した。塩基配列の決定のための反応はBigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit（PE Biosystems）を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読し、配列番号：38に示すDNA配列を得た。

参考例28 ヒトGPR8リガンド前駆体タンパク質をコードするcDNAのクローニング

- ヒト視床下部cDNAを鋳型として、ヒトGPR8リガンド前駆体タンパク質をコードするcDNAの5'上流塩基配列を基に作製したプライマーとヒトGPR8リガンド前駆体タンパク質をコードするcDNAの3'下流塩基配列を基に作製したプライマーでPCR増幅を行なうことにより、ヒトGPR8リガンド前駆体タンパク質をコードするcDNAをクローニングした。PCRの反応液組成と反応条件は以下のとおりである。反応液は、ヒト視床下部Marathon-Ready cDNA (CLONTECH) 1 μ l、配列番号：39の合成DNAプライマー0.5 μ M、配列番号：40の合成DNAプライマー0.5 μ M、0.4 mM dNTPs、2.5 mM MgCl₂、5% DMSO、LATAqポリメラーゼ(宝酒造) 0.2 μ lおよび酵素に付属のバッファーで総反応量を20 μ lとし、サーマルサイクラー(PE Biosystems)を用い、96℃・60秒の加熱の後、96℃・30秒、64℃・30秒、72℃・120秒のサイクルを35回、最後に72℃で10分間保温した。増幅したDNAを1.5%のアガロースゲル電気泳動により分離した後、約700塩基長のDNAをカミソリで切り出し、DNAをQIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン)を用いて回収した。このDNAを、TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen)のプロトコールに従ってpCR2.1-TOPOベクターへクローニングした。これをエシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) TOP10 competent cell (Invitrogen)に導入して形質転換した後、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリンおよびX-galを含むLB寒天培地で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌したつま楊枝を用いて分離し、形質転換体を得た。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、QIAwell 8 Plasmid Kit (キアゲン)を用いてプラスミドDNAを調製した。塩基配列の決定のための反応はBigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Biosystems)を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読し、配列番号：41に示すDNA配列を得た。
- この配列(配列番号：41)はヒトGPR8リガンド前駆体タンパク質をコードするためこのDNAを含むプラスミドで形質転換した大腸菌をTOP10/pCR2.1-TOPOヒトGPR8リガンド前駆体 (*Escherichia coli* TOP10/pCR2.1-TOPO Human GPR8 Ligand Precursor)と命名した。
- 配列番号：41に示すDNA配列には、参考例11に記載したヒトGPR8リ

- ガンドペプチドのアミノ酸配列をコードするようなフレームが存在するが、その5'上流側にはタンパク質翻訳の開始コドンであると予想されるATGが存在しない。しかし、これまでに幾つかのタンパク質でATG以外のコドンを開始コドンとすることが予想されている例が報告されている（ヒト塩基性線維芽細胞増殖因子（H. P. rats et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86巻、1836-1840頁、1989年、R. Z. FlorkiewiczおよびA. Sommer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86巻、3978-3981頁、1989年）、マウスレチノイン酸受容体 $\beta 4$ （S. Nagpal et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89巻、2718頁、1992年）、ヒトホスホリボシルピロリン酸合成酵素（M. Taira et al., J. Biol. Chem., 265巻、16491-16497頁、1990年）、ショウジョウバエコリンアセチル転移酵素（H. Sugihara et al., J. Biol. Chem., 265巻、21714-21719頁、1990年））。

- これらの例ではATGに代わりLeuをコードするCTGが開始コドンとして仮定されていることが多い。ヒトGPR8リガンド前駆体タンパク質においても同様であると考え、後述のブタあるいはラットのGPR8リガンドホモログの前駆体タンパク質との比較からこれらの前駆体タンパク質における開始コドンと予想されるATGにほぼ対応する位置に存在するCTGコドンを開始コドンと仮定し、前駆体タンパク質の配列を推定した。この仮想的ヒトGPR8リガンド前駆体タンパク質のアミノ酸配列を配列番号：42に示した。また、仮想的ヒトGPR8リガンド前駆体タンパク質のアミノ酸配列およびDNA配列を図6に示した。

20

参考例29 ブタ脊髄cDNAの作製

- ブタ脊髄cDNAは、Marathon™ cDNA Amplification Kit (CLONTECH)を用いてブタ脊髄poly A(+) RNAから作製した。ブタ脊髄poly A(+) RNAは、ブタ脊髄から以下のように調製した。ブタ脊髄を、ISOGEN（日本ジーン）中にてポリトロンホモゲナイザーで完全に破碎し、この破碎溶液からISOGEN溶液を用いたtotal RNA調製法に従ってブタ脊髄total RNAを得た。次に、ブタ脊髄total RNAからmRNA Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech) に添付のoligo dT celluloseカラムを用いたクロマトグラフィーを2回行なうことにより、7 μ gのブタ脊髄poly A(+) RNAを得た。RACE PCRに供したcDNAは1st strand cDNA合成

25

を除き、キットに添付のプロトコールに従って作製した。1st strand cDNAは、キットに添付の逆転写酵素AMVの代わりに逆転写酵素MMLV (-RNase H) (RevTra Ace, 東洋紡) を用いて、1 μ gのブタ脊髄poly A (+) RNAから合成した。

5 参考例30 ブタGPR8リガンド前駆体タンパク質をコードするcDNAの5' 上流端のクローニング

1回目の5' RACE PCR クローニングと、そのPCR増幅 DNAの塩基配列を利用した2回目の5' RACE PCR クローニングにより、GPR8のリガンドペプチド
10 のブタホモログ (以下、ブタGPR8リガンドと記載することがある) の前駆体タンパク質をコードするcDNAの5' 上流塩基配列を明らかにした。

1回目の5' RACE PCR クローニングは、上記ブタ脊髄cDNAを鋳型としてキットに添付のAP1プライマーと配列番号: 43の合成プライマーでPCR反応を行ない、次にこのPCR反応液を鋳型としてキットに添付のAP2プライマーと配列番号: 44の合成プライマーでPCR反応を行なうことにより達成された。
15 。PCRの反応液組成と反応条件は以下のとおりである。反応液はキットに添付のTricine-EDTA Bufferで50倍希釈したブタ脊髄cDNA 4 μ l、AP1プライマー0.5 μ M、配列番号: 43の合成DNAプライマー0.5 μ M、0.4 mM dNTPs、LA Taqポリメラーゼ (宝酒造) 0.2 μ lおよび酵素に付属のGC (I) バッファーで総反応量を20 μ lとし、サーマルサイクラー (PE Biosystems) を用い、96 $^{\circ}$ C・120秒の
20 加熱の後、96 $^{\circ}$ C・30秒、68 $^{\circ}$ C・180秒のサイクルを30回繰り返し、さらに72 $^{\circ}$ Cで10分間保温した。次に、キットに添付のTricine-EDTA Bufferで100倍希釈したPCR反応液1 μ l、AP2プライマー0.5 μ M、配列番号: 44の合成DNAプライマー0.5 μ M、0.4 mM dNTPs、Advantage-GC 2ポリメラーゼ (CLONTECH) 0.2 μ l
25 および酵素に付属のバッファーで総反応量を20 μ lとし、サーマルサイクラー (PE Biosystems) を用い、96 $^{\circ}$ C・60秒の加熱の後、96 $^{\circ}$ C・30秒、72 $^{\circ}$ C・180秒のサイクルを3回、次に96 $^{\circ}$ C・30秒、70 $^{\circ}$ C・180秒のサイクルを3回、次に96 $^{\circ}$ C・30秒、68 $^{\circ}$ C・180秒のサイクルを4回、次に96 $^{\circ}$ C・30秒、64 $^{\circ}$ C・30秒、72 $^{\circ}$ C・180秒のサイクルを15回繰り返し、最後に72 $^{\circ}$ Cで10分間保温した。増幅したDNAを1.2 %のアガロースゲル電気泳動により分離した後、約300塩基長のDNAをカミソリ

で切り出し、DNAをQIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン) を用いて回収した。このDNAを、TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) のプロトコールに従ってpCR2.1-TOPOベクターへクローニングした。これをエシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) TOP10F' competent cell (Invitrogen) に導入して形質転換した後、

5 cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリン、IPTGおよびX-galを含むLB寒天培地で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌したつま楊枝を用いて分離し、形質転換体を得た。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、QIAwell 8 Plasmid Kit (キアゲン) を用いてプラスミドDNAを調製した。塩基配列の決定のための反応はBigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Biosystems) を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読し、配列番号：45に示すDNA配列を得た。

2回目の5' RACE PCR クローニングは、ブタ脊髄cDNAを鋳型としてキットに添付のAP1プライマーと配列番号：46の合成プライマーでPCR反応を行ない、次にこのPCR反応液を鋳型としてキットに添付のAP2プライマーと配列番号：47の合成プライマーでPCR反応を行なうことにより達成された。PCRの反応液組成と反応条件は以下のとおりである。反応液は、キットに添付のTricine-EDTA Bufferで50倍希釈したブタ脊髄cDNA 1 μ l、AP1プライマー0.5 μ M、配列番号：46の合成DNAプライマー0.5 μ M、0.4 mM dNTPs、Advantage-GC 2ポリメラーゼ (CLONTECH) 0.2 μ lおよび酵素に付属のバッファーで総反応量を20 μ lとし、サーマルサイクラー (PE Biosystems) を用い、96 $^{\circ}$ C・60秒の加熱の後、96 $^{\circ}$ C・30秒、72 $^{\circ}$ C・180秒のサイクルを5回、次に96 $^{\circ}$ C・30秒、70 $^{\circ}$ C・180秒のサイクルを5回、次に96 $^{\circ}$ C・30秒、68 $^{\circ}$ C・180秒のサイクルを20回繰り返す、最後に72 $^{\circ}$ Cで10分間保温した。次に、キットに添付のTricine-EDTA Bufferで100倍希釈したPCR反応液1 μ l、AP2プライマー0.5 μ M、配列番号：47の合成DNAプライマー0.5 μ M、0.4 mM dNTPs、Advantage-GC 2ポリメラーゼ (CLONTECH) 0.2 μ lおよび酵素に付属のバッファーで総反応量を20 μ lとし、サーマルサイクラー (PE Biosystems) を用い、96 $^{\circ}$ C・60秒の加熱の後、96 $^{\circ}$ C・30秒、68 $^{\circ}$ C・180秒のサイクルを31回繰り返す、最後に72 $^{\circ}$ Cで10分間保温した。増幅したDNAを2.0%のアガロースゲル電気泳動により分離した後、約200塩基長のD

- NAをカミソリで切り出し、DNAをQIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン) を用いて回収した。このDNAを、TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) のプロトコールに従ってpCR2.1-TOPOベクターへクローニングした。これをエシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) TOP10F' competent cell (Invitrogen) に導入して形質転換した後、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリン、IPTGおよびX-galを含むLB寒天培地で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌したつま楊枝を用いて分離し、形質転換体を得た。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、QIAwell 8 Plasmid Kit (キアゲン) を用いてプラスミドDNAを調製した。塩基配列の決定のための反応はBigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Biosystems) を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読し、配列番号：48に示すDNA配列を得た。

参考例31 ブタGPR8リガンド前駆体タンパク質をコードするcDNAの3' 下流端のクローニング

- 15 ブタGPR8リガンド前駆体タンパク質をコードするcDNAの5'上流端の塩基配列を基に作製したプライマーを用いた3' RACE PCRクローニングにより、ブタGPR8リガンドペプチドの前駆体タンパク質をコードするcDNAの3'下流塩基配列を明らかにした。3' RACE PCR クローニングは、ブタ脊髄cDNAを鋳型としてキットに添付のAP-1プライマーと配列番号：49の合成プライマーでPCR反応を行ない、次にこのPCR反応液を鋳型としてキットに添付のAP-2プライマーと配列番号：50の合成プライマーでPCR反応を行なうことにより達成された。PCRの反応液組成と反応条件は以下のとおりである。反応液は、キットに添付のTricine-EDTA Bufferで50倍希釈したブタ脊髄cDNA 1 μ l、AP-1プライマー0.5 μ M、配列番号：49の合成DNAプライマー0.5 μ M、0.4 mM
- 20 dNTPs、Advantage-GC 2ポリメラーゼ (CLONTECH) 0.2 μ lおよび酵素に付属のバッファーで総反応量を20 μ lとし、サーマルサイクラー (PE Biosystems) を用い、96 $^{\circ}$ C・60秒の加熱の後、96 $^{\circ}$ C・30秒、72 $^{\circ}$ C・120秒のサイクルを5回、次に96 $^{\circ}$ C・30秒、70 $^{\circ}$ C・120秒のサイクルを5回、次に96 $^{\circ}$ C・30秒、68 $^{\circ}$ C・120秒のサイクルを20回繰り返し、最後に72 $^{\circ}$ Cで10分間保温した。次に、キットに添付のTricine-
- 25

EDTA Bufferで100倍希釈したPCR反応液1 μ l、AP 2プライマー0.5 μ M、配
列番号：50の合成DNAプライマー0.5 μ M、0.4 mM dNTPs、Advantage-GC 2ポ
リメラーゼ (CLONTECH) 0.2 μ lおよび酵素に付属のバッファーで総反応量を20 μ l
とし、サーマルサイクラー (PE Biosystems) を用い、96 $^{\circ}$ C・120秒の加熱の後、9
5 6 $^{\circ}$ C・30秒、68 $^{\circ}$ C・120秒のサイクルを31回繰り返す、最後に72 $^{\circ}$ Cで10分間保温
した。増幅したDNAを2.0%のアガロースゲル電気泳動により分離した後、約6
50塩基長のDNAをカミソリで切り出し、DNAをQIAquick Gel Extraction Ki
t (キアゲン) を用いて回収した。このDNAを、TOPO TA Cloning Kit (Invitro
gen) のプロトコールに従ってpCR2.1-TOPOベクターへクローニングした。これを
10 エシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) TOP10F' competent cell (Invitrogen
) に導入して形質転換した後、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリン
およびX-gal、IPTGを含むLB寒天培地で選択し、白色を呈するクロー
ンのみを滅菌したつま楊枝を用いて分離し、形質転換体を得た。個々のクロー
ンをアンピシリンを含むLB培地で一晩培養し、QIAwell 8 Plasmid Kit (キアゲ
15 ン) を用いてプラスミドDNAを調製した。塩基配列の決定のための反応はBigD
ye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Biosystems) を用い
て行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読し、配列番号：51に示すDN
A配列を得た。

20 参考例32 プタGPR8リガンド前駆体タンパク質をコードするcDNAのク
ローニング

ブタ脊髄cDNAを鋳型として、ブタGPR8リガンド前駆体タンパク質をコ
ードするcDNAの5'上流塩基配列を基に作製したプライマーとブタGPR8リ
ガンド前駆体タンパク質をコードするcDNAの3'下流塩基配列を基に作製した
25 プライマーでPCR増幅を行なうことにより、ブタGPR8リガンド前駆体タン
パク質をコードするcDNAをクローニングした。PCRの反応液組成と反応条
件は以下のとおりである。反応液は、キットに添付のTricine-EDTA Bufferで50
倍希釈したブタ脊髄cDNA 1 μ l、配列番号：52の合成DNAプライマー0.5
 μ M、配列番号：53の合成DNAプライマー0.5 μ M、0.4 mM dNTPs、Advantage

2ポリメラーゼ (CLONTECH) 0.2 μ l および酵素に付属のバッファーで総反応量を20 μ l とし、サーマルサイクラー (PE Biosystems) を用い、96℃・60秒の加熱の後、96℃・30秒、72℃・75秒のサイクルを4回、次に96℃・30秒、70℃・75秒のサイクルを4回、次に96℃・30秒、68℃・75秒のサイクルを4回、次に96℃・30秒、64℃・30秒、72℃・45秒のサイクルを5回、次に96℃・30秒、60℃・30秒、72℃・45秒のサイクルを20回繰り返し、最後に72℃で10分間保温した。増幅したDNAを1.2%のアガロースゲル電気泳動により分離した後、約600塩基長のDNAをカミソリで切り出し、DNAをQIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン) を用いて回収した。このDNAを、TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) のプロトコールに従ってpCR2.1-TOPOベクターへクローニングした。これをエシェリヒア コリ (Escherichia coli) TOP10 competent cell (Invitrogen) に導入して形質転換した後、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリンおよびX-galを含むLB寒天培地で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌したつま楊枝を用いて分離し、形質転換体を得た。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晩培養し、QIAwell 8 Plasmid Kit (キアゲン) を用いてプラスミドDNAを調製した。塩基配列の決定のための反応はBigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Biosystems) を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読し、配列番号：54に示すDNA配列を得た。この配列（配列番号：54）はブタGPR8リガンド前駆体タンパク質をコードするためこのDNAを含むプラスミドで形質転換した大腸菌をTOP10/pCR2.1-TOPOブタGPR8リガンド前駆体 (Escherichia coli TOP10/pCR2.1-TOPO Porcine GPR8 Ligand Precursor) と命名した。

配列番号：54のDNA配列がコードするブタGPR8リガンド前駆体タンパク質のアミノ酸配列を配列番号：55に示した。この前駆体タンパク質のアミノ酸配列には参考例10に記載のGPR8発現細胞膜画分に対するGTP γ S結合活性を指標にブタ視床下部より単離されたGPR8リガンドペプチドのアミノ酸配列分析によって明らかにされたアミノ末端から17残基までの配列が存在した。さらにその配列のカルボキシ末端側にはGPR8リガンドペプチドのヒトホモログ前駆体タンパク質の場合と同様に、通常の生理活性ペプチドが切り出される

と考えられるArg-Argの配列(Seidah, N. G. et al., Ann. N. Y. Acad. Sci., 839巻、9-24頁、1998年)が2ヶ所存在した。このことから、GPR8リガンドペプチドのブタホモログのアミノ酸配列は配列番号：56および57のいずれかもしくは両方であると推定された。ブタGPR8リガンド前駆体タンパク質の5 アミノ酸配列およびDNA配列を図7に示した。

参考例33 ラットGPR8リガンド前駆体タンパク質の一部をコードするcDNA断片のクローニング

参考例10に記載したように、GPR8発現細胞膜画分に対するGTPγS結合活性を指標にブタ視床下部から精製したペプチドのアミノ末端から17アミノ酸配列(配列番号：6)に基づいてデータベース検索を行なったところ、配列番号：11の塩基配列に合致するラットEST塩基配列(アクセッション番号：H31598)が見出された。このDNA配列は15アミノ酸の配列がブタ視床下部から精製したペプチドのアミノ酸配列(配列番号：6)と同一となる翻訳枠を持って15 いた。このH31598は、ラットPC12細胞から作製したcDNAライブラリー由来のEST配列であり、未確定な7塩基を含む260塩基からなる。このH31598はGPR8リガンドのラットホモログペプチド(以下、ラットGPR8リガンドと記載することがある)の前駆体タンパク質の一部をコードしていると推定されたのでその正確な塩基配列を決定するため、H31598の5'塩基配列と3'塩基配列を基20 に作製したそれぞれのプライマーでラット脳Marathon-Ready cDNA (CLONTECH)を鋳型としたPCRクローニングを行なった。PCRの反応液組成と反応条件は以下のとおりである。ラット脳Marathon cDNA (CLONTECH) 2μl、配列番号：60の合成DNAプライマー0.5μM、配列番号：61の合成DNAプライマー0.5μM、0.4 mM dNTPs、Advantage-GC 2ポリメラーゼ (CLONTECH) 0.2μlおよび酵素25 に付属のバッファーで総反応量を20μlとし、サーマルサイクラー (PE Biosystems) を用い、96℃・60秒の加熱の後、次に96℃・30秒、60℃・30秒、72℃・60秒のサイクルを35回繰り返し、最後に72℃で10分間保温した。増幅したDNAを4.0%のアガロースゲル電気泳動により分離した後、約250塩基長のDNAをカミソリで切り出し、DNAをQIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン) を用いて回収

- した。このDNAを、TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen)のプロトコールに従ってpCR2.1-TOPOベクターへクローニングした。これをエシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) TOP10 competent cell (Invitrogen) に導入して形質転換した後、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリンおよびX-galを含むLB寒天
- 5 培地で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌したつま楊枝を用いて分離し、形質転換体を得た。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、QIAwell 8 Plasmid Kit (キアゲン) を用いてプラスミドDNAを調製した。塩基配列の決定のための反応はBigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Biosystems) を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読
- 10 し、配列番号：62に示すDNA配列を得た。PCRクローニングしたDNAの塩基配列（配列番号：62）とH31598の塩基配列との比較により、1塩基欠失の読み誤りがH31598の塩基配列にあることが明らかになった。

参考例34 ラットGPR8リガンド前駆体タンパク質をコードするcDNAの

15 5' 上流端のクローニング

- 5'RACE PCR クローニングによりラットGPR8リガンド前駆体タンパク質をコードするcDNAの5' 上流塩基配列を明らかにした。5' RACE PCR クローニングは、ラット脳Marathon-Ready cDNA (CLONTECH) を鋳型としてキットに添付のAP1プライマーと配列番号：63の合成プライマーでPCR反応を行ない、
- 20 次にこのPCR反応液を鋳型としてキットに添付のAP2プライマーと配列番号：64の合成プライマーでPCR反応を行なうことにより達成された。PCRの反応液組成と反応条件は以下のとおりである。反応液はラット脳Marathon cDNA 2 μ l、AP1プライマー0.5 μ M、配列番号：63の合成DNAプライマー0.5 μ M、0.4 mM dNTPs、LATaqポリメラーゼ（宝酒造）0.2 μ lおよび酵素に付属の
- 25 GC (I) バッファーで総反応量を20 μ lとし、サーマルサイクラー（PE Biosystems）を用い、96℃・60秒の加熱の後、96℃・30秒、68℃・120秒のサイクルを30回繰り返す、さらに72℃で10分間保温した。次に、キットに添付のTricine-EDTA Bufferで200倍希釈したPCR反応液2 μ l、AP2プライマー0.5 μ M、配列番号：64の合成DNAプライマー0.5 μ M、0.4 mM dNTPs、Advantage-GC 2ポリメ

- ラーゼ (CLONTECH) 0.2 μ l および酵素に付属のバッファーで総反応量を20 μ l とし、サーマルサイクラー (PE Biosystems) を用い、96℃・60秒の加熱の後、96℃・30秒、68℃・120秒のサイクルを31回、最後に72℃で10分間保温した。増幅したDNAを1.2%のアガロースゲル電気泳動により分離した後、約600塩基長の
- 5 DNAをカミソリで切り出し、DNAをQIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン) を用いて回収した。このDNAを、TOP0 TA Cloning Kit (Invitrogen) のプロトコールに従ってpCR2.1-TOP0ベクターへクローニングした。これをエシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) TOP10 competent cell (Invitrogen) に導入して形質転換した後、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリンおよびX-gal
- 10 を含むLB寒天培地で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌したつま楊枝を用いて分離し、形質転換体を得た。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、QIAwell 8 Plasmid Kit (キアゲン) を用いてプラスミドDNAを調製した。塩基配列の決定のための反応はBigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Biosystems) を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサ
- 15 ーを用いて解読し、配列番号：65に示すDNA配列を得た。

参考例35 ラットGPR8リガンド前駆体タンパク質をコードするcDNAの3' 下流端のクローニング

- ラットGPR8リガンド前駆体タンパク質をコードするcDNAの5' 上流端の塩基配列を基に作製したプライマーおよびラットGPR8リガンド前駆体タン
- 20 パク質の一部をコードするcDNA断片配列を基に作製したプライマーを用いた3' RACE PCRクローニングにより、ラットGPR8リガンド前駆体タンパク質をコードするcDNAの3' 下流塩基配列を明らかにした。3' RACE PCR クローニングは、ラット脳Marathon-Ready cDNA (CLONTECH) を鋳型としてキットに添付の
- 25 AP1プライマーと配列番号：66の合成プライマーでPCR反応を行ない、次にこのPCR反応液を鋳型としてキットに添付のAP2プライマーと配列番号：67の合成プライマーでPCR反応を行なうことにより達成された。PCRの反応液組成と反応条件は以下のとおりである。反応液は、ラット脳Marathon-Ready cDNA 2 μ l、AP1プライマー0.5 μ M、配列番号：66の合成DNAプライマ

- ー0.5 μ M、0.4 mM dNTPs、Advantage-GC 2ポリメラーゼ (CLONTECH) 0.4 μ lおよび酵素に付属のバッファーで総反応量を20 μ lとし、サーマルサイクラー (PE Biosystems) を用い、96℃・60秒の加熱の後、96℃・30秒、68℃・180秒のサイクルを30回繰り返す、最後に72℃で10分間保温した。次に、キットに添付のTricine-EDTA Bufferで200倍希釈したPCR反応液2 μ l、AP 2 プライマー0.5 μ M、配列番号：67の合成DNAプライマー0.5 μ M、0.4 mM dNTPs、Advantage-GC 2ポリメラーゼ (CLONTECH) 0.4 μ lおよび酵素に付属のバッファーで総反応量を20 μ lとし、サーマルサイクラー (PE Biosystems) を用い、96℃・60秒の加熱の後、96℃・30秒、68℃・180秒のサイクルを30回繰り返す、最後に72℃で10分間保温した。増幅したDNAを1.2%のアガロースゲル電気泳動により分離した後、約600塩基長のDNAをカミソリで切り出し、DNAをQIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン) を用いて回収した。このDNAを、TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) のプロトコールに従ってpCR2.1-TOPOベクターへクローニングした。これをエシェリヒア コリ (Escherichia coli) TOP10 competent cell (Invitrogen) に導入して形質転換した後、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリンおよびX-galを含むLB寒天培地で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌したつま楊枝を用いて分離し、形質転換体を得た。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、QIAwell 8 Plasmid Kit (キアゲン) を用いてプラスミドDNAを調製した。塩基配列の決定のための反応はBigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Biosystems) を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読し、配列番号：68に示すDNA配列を得た。

参考例36 ラットGPR8リガンド前駆体タンパク質をコードするcDNAのクローニング

- 25 ラット脳cDNAを鋳型として、ラットGPR8リガンド前駆体タンパク質をコードするcDNAの5'上流塩基配列を基にしたプライマーとラットGPR8リガンド前駆体タンパク質をコードするcDNAの3'下流塩基配列を基にしたプライマーでPCR増幅を行なうことにより、ラットGPR8リガンド前駆体タンパク質をコードするcDNAをクローニングした。PCRの反応液組成と反応条件

は以下のとおりである。反応液は、ラット脳Marathon-Ready cDNA 1 μ l、配列番号：69の合成DNAプライマー0.5 μ M、配列番号：70の合成DNAプライマー0.5 μ M、0.4 mM dNTPs、Advantage 2ポリメラーゼ (CLONTECH) 0.4 μ lおよび酵素に付属のバッファーで総反応量を20 μ lとし、サーマルサイクラー (PE Biosystems) を用い、96 $^{\circ}$ C・60秒の加熱の後、96 $^{\circ}$ C・30秒、60 $^{\circ}$ C・30秒、72 $^{\circ}$ C・60秒のサイクルを35回繰り返し、最後に72 $^{\circ}$ Cで10分間保温した。増幅したDNAを1.2%のアガロースゲル電気泳動により分離した後、約750塩基長のDNAをカミソリで切り出し、DNAをQIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン) を用いて回収した。このDNAを、TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) のプロトコールに従ってpCR2.1-TOPOベクターへクローニングした。これをエシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) TOP10 competent cell (Invitrogen) に導入して形質転換した後、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリンおよびX-galを含むLB寒天培地で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌したつま楊枝を用いて分離し、形質転換体を得た。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、QIAwell 8 Plasmid Kit (キアゲン) を用いてプラスミドDNAを調製した。塩基配列の決定のための反応はBigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Biosystems) を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読し、配列番号：71に示すDNA配列を得た。この配列 (配列番号：71) は、ラットGPR8リガンド前駆体タンパク質をコードするためこのDNAを含むプラスミドで形質転換した大腸菌をTOP10/pCR2.1-TOPOラットGPR8リガンド前駆体 (*Escherichia coli* TOP10/pCR2.1-TOPO Rat GPR8 Ligand Precursor) と命名した。

配列番号：71のDNA配列がコードするラットGPR8リガンド前駆体タンパク質のアミノ酸配列を配列番号：72に示した。この前駆体タンパク質のアミノ酸配列には参考例10に記載のGPR8発現細胞膜画分に対するGTP γ S結合活性を指標にブタ視床下部より単離されたGPR8リガンドペプチドのアミノ酸配列分析によって明らかにされたアミノ末端から17残基までの配列と5残基目および17残基目のアミノ酸のみが異なる類似した配列が存在した。さらにその配列のカルボキシ末端側にはGPR8リガンドペプチドのヒトあるいはブタホ

モログ前駆体タンパク質の場合と同様に、通常の生理活性ペプチドが切り出され
ると考えられるArg-Argの配列 (Seidah, N. G. et al., Ann. N. Y. Aca
d. Sci., 839巻、9-24頁、1998年) が2ヶ所存在した。これらのことから、GP
R 8リガンドペプチドのラットホモログのアミノ酸配列は配列番号：73および
5 74のいずれかもしくは両方であると推定された。ラットGPR 8リガンド前駆
体タンパク質のアミノ酸配列およびDNA配列を図8に示した。

参考例37 マウスGPR 8リガンド前駆体タンパク質の一部をコードするcD
NA断片のクローニング

- 10 GPR 8リガンドペプチドのマウスホモログ (以下、マウスGPR 8リガンド
と記載することがある) の前駆体タンパク質を取得するため、マウス精巣cDN
Aを鋳型として、PCR増幅を行ない、増幅DNAの塩基配列を決定した。PC
Rの反応液組成と反応条件は以下のとおりである。マウス精巣cDNA (CLONTE
CH) 1 μ l、配列番号：78の合成DNAプライマー0.5 μ M、配列番号：79の合
15 成DNAプライマー0.5 μ M、0.4 mM dNTPs、LATaqポリメラーゼ (宝酒造) 0.2 μ l
および酵素に付属のGC (I) バッファーで総反応量を20 μ lとし、サーマルサイク
ラー (PE Biosystems) を用い、96 $^{\circ}$ C・120秒の加熱の後、96 $^{\circ}$ C・30秒、68 $^{\circ}$ C・12
0秒のサイクルを10回繰り返し、次に96 $^{\circ}$ C・30秒、64 $^{\circ}$ C・30秒、72 $^{\circ}$ C・120秒のサイ
クルを25回繰り返し、最後に72 $^{\circ}$ Cで10分間保温した。増幅したDNAを1.5%の
20 アガロースゲル電気泳動により分離した後、約350塩基長のDNAをカミソリで切
り出し、DNAをQIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン) を用いて回収した。
このDNAを、TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) のプロトコールに従ってpCR2
.1-TOPOベクターへクローニングした。これをエシェリヒア コリ (Escherichia c
oli) TOP10 competent cell (Invitrogen) に導入して形質転換した後、cDNA
25 挿入断片を持つクローンをアンピシリンおよびX-galを含むLB寒天培地で
選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌したつま楊枝を用いて分離し、形質転
換体を得た。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、QIAw
ell 8 Plasmid Kit (キアゲン) を用いてプラスミドDNAを調製した。塩基配列
の決定のための反応はBigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Ki

t (PE Biosystems) を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読した (配列番号: 80)。

参考例 38 マウス脳 cDNA の作製

- 5 マウス脳 cDNA は、SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (CLONTECH) を用いてマウス脳 poly A (+) RNA (CLONTECH) から、キットに添付のプロトコールに従って作製した。合成した 1st strand cDNA 溶液を、キットに添付の Tricine-EDTA Buffer で 10 倍に希釈し、この溶液を RACE PCR 反応に供した。

10 参考例 39 マウス GPR8 リガンド前駆体タンパク質をコードする cDNA の 5' 上流端のクローニング

- 5' RACE PCR クローニングにより、マウス GPR8 リガンド前駆体タンパク質をコードする cDNA の 5' 上流塩基配列を明らかにした。5' RACE PCR クローニングは、マウス脳 cDNA を鋳型として SMART™ RACE cDNA Amplification Kit に添付の Universal Primer Mix と配列番号: 81 の合成プライマーで PCR 反応を行ない、次にこの PCR 反応液を鋳型としてキットに添付の Nested Universal Primer と配列番号: 82 の合成プライマーで PCR 反応を行なうことにより達成された。PCR の反応液組成と反応条件は以下のとおりである。反応液はマウス脳 cDNA 1 μ l、Universal Primer Mix 2 μ l、配列番号: 81 の合成 DNA プライマー 0.2 μ M、0.8 mM dNTPs、Advantage-GC 2 ポリメラーゼ (CLONTECH) 0.4 μ l および酵素に付属のバッファーで総反応量を 20 μ l とし、サーマルサイクラー (PE Biosystems) を用い、96℃・120 秒の加熱の後、96℃・30 秒、68℃・120 秒のサイクルを 30 回繰り返す、さらに 72℃ で 10 分間保温した。次に、キットに添付の Tricine-EDTA Buffer で 50 倍希釈した PCR 反応液 0.5 μ l、Nested Universal Primer 0.5 μ M、配列番号: 82 の合成 DNA プライマー 0.5 μ M、0.8 mM dNTPs、Advantage-GC 2 ポリメラーゼ (CLONTECH) 0.4 μ l および酵素に付属のバッファーで総反応量を 20 μ l とし、サーマルサイクラー (PE Biosystems) を用い、96℃・120 秒の加熱の後、96℃・30 秒、60℃・30 秒、72℃・120 秒のサイクルを 30 回繰り返す、さらに 72℃ で 10 分間保温した。増幅した DNA を 1.5% のアガロースゲル電気

- 泳動により分離した後、約300塩基長のDNAをカミソリで切り出し、DNAをQIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン) を用いて回収した。このDNAを、TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) のプロトコールに従ってpCR2.1-TOPOベクターへクローニングした。これをエシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) TOP10 competent cell (Invitrogen) に導入して形質転換した後、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリンおよびX-galを含むLB寒天培地で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌したつま楊枝を用いて分離し、形質転換体を得た。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、QIAwell 8 Plasmid Kit (キアゲン) を用いてプラスミドDNAを調製した。塩基配列の決定のため
- 5 petent cell (Invitrogen) に導入して形質転換した後、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリンおよびX-galを含むLB寒天培地で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌したつま楊枝を用いて分離し、形質転換体を得た。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、QIAwell 8 Plasmid Kit (キアゲン) を用いてプラスミドDNAを調製した。塩基配列の決定のため
- 10 の反応はBigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Biosystems) を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読し、配列番号：83に示すDNA配列を得た。

参考例40 マウスGPR8リガンド前駆体タンパク質をコードするcDNAの

- 15 3' 下流端のクローニング
- 3' RACE PCRクローニングにより、マウスGPR8リガンド前駆体タンパク質をコードするcDNAの3' 下流塩基配列を明らかにした。3' RACE PCR クローニングは、マウス脳cDNAを鋳型としてSMARTTM RACE cDNA Amplification Kit に添付のUniversal Primer Mixと配列番号：84の合成プライマーでPCR反応
- 20 を行ない、次にこのPCR反応液を鋳型としてキットに添付のNested Universal Primerと配列番号：85の合成プライマーでPCR反応を行なうことにより達成された。PCRの反応液組成と反応条件は以下のとおりである。反応液は、マウス脳cDNA 1 μ l、Universal Primer Mix 2 μ l、配列番号：84の合成DNAプライマー0.5 μ M、0.8 mM dNTPs、Advantage-GC 2ポリメラーゼ (CLONTECH) 0.4
- 25 μ lおよび酵素に付属のバッファーで総反応量を20 μ lとし、サーマルサイクラー (PE Biosystems) を使い、96 $^{\circ}$ C・120秒の加熱の後、96 $^{\circ}$ C・30秒、68 $^{\circ}$ C・120秒のサイクルを30回繰り返し、最後に72 $^{\circ}$ Cで10分間保温した。次に、キットに添付のTricine-EDTA Bufferで50倍希釈したPCR反応液0.5 μ l、Nested Universal Primer 0.5 μ M、配列番号：85の合成DNAプライマー0.5 μ M、0.8 mM dNTP

- s、 Advantage-GC 2ポリメラーゼ (CLONTECH) 0.4 μ lおよび酵素に付属のバッファ
ーで総反応量を20 μ lとし、サーマルサイクラー (PE Biosystems) を用い、 96℃
・ 120秒の加熱の後、 96℃・ 30秒、 64℃・ 30秒、 72℃・ 120秒のサイクルを 30回
繰返し、最後に72℃で10分間保温した。増幅したDNAを1.5%のアガロースゲ
5 ル電気泳動により分離した後、約700塩基長のDNAをカミソリで切り出し、DN
AをQIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン) を用いて回収した。このDNAを
、TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) のプロトコールに従ってpCR2.1-TOPOベクタ
ーへクローニングした。これをエシェリヒア コリ (Escherichia coli) TOP10 c
ompetent cell (Invitrogen) に導入して形質転換した後、cDNA挿入断片を持
10 つクローンをアンピシリンおよびX-galを含むLB寒天培地で選択し、白色
を呈するクローンのみを滅菌したつま楊枝を用いて分離し、形質転換体を得た。
個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、QIAwell 8 Plasmid
d Kit (キアゲン) を用いてプラスミドDNAを調製した。塩基配列の決定のため
の反応はBigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Biosys
15 tems) を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読し、配列番号：86
に示すDNA配列を得た。

参考例4.1 マウスGPR8リガンド前駆体タンパク質をコードするcDNAの
クローニング

- 20 マウス脳cDNAを鋳型として、マウスGPR8リガンド前駆体タンパク質を
コードするcDNAの5' 上流塩基配列を基にしたプライマーとマウスGPR8
リガンド前駆体タンパク質をコードするcDNAの3' 下流塩基配列を基にした
プライマーでPCR増幅を行なうことにより、マウスGPR8リガンド前駆体タ
ンパク質をコードするcDNAをクローニングした。PCRの反応液組成と反応
25 条件は以下のとおりである。反応液は、マウス脳cDNA 0.5 μ l、配列番号：8
7の合成DNAプライマー0.5 μ M、配列番号：88の合成DNAプライマー0.5
 μ M、1.6 mM dNTPs、LATAqポリメラーゼ (宝酒造) 0.2 μ lおよび酵素に付属のGC
(I) バッファで総反応量を20 μ lとし、サーマルサイクラー (PE Biosystems
) を用い、96℃・ 120秒の加熱の後、96℃・ 30秒、64℃・ 30秒、72℃・ 120秒のサ

- イクルを40回繰り返し、最後に72℃で10分間保温した。増幅したDNAを1.5 %のアガロースゲル電気泳動により分離した後、約700塩基長のDNAをカミソリで切り出し、DNAをQIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン) を用いて回収した。このDNAを、TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) のプロトコールに従って
- 5 CR2.1-TOPOベクターへクローニングした。これをエシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) TOP10 competent cell (Invitrogen) に導入して形質転換した後、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリンおよびX-galを含むLB寒天培地で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌したつま楊枝を用いて分離し、形質転換体を得た。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、Q
- 10 IAwell 8 Plasmid Kit (キアゲン) を用いてプラスミドDNAを調製した。塩基配列の決定のための反応はBigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Biosystems) を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読し、配列番号：89に示すDNA配列を得た。この配列（配列番号：89）は、マウスGPR8リガンド前駆体タンパク質をコードするため、このDNAを含むプラスミドで形質転換した大腸菌をTOP10/pCR2.1-TOPOマウスGPR8リガンド前駆体 (*Escherichia coli* TOP10/pCR2.1-TOPO Mouse GPR8 Ligand Precursor) と命名した。
- 15

- 配列番号：89に示すDNA配列には、参考例10に記載のGPR8発現細胞膜画分に対するGTPγS結合活性を指標にブタ視床下部より単離されたGPR
- 20 8リガンドペプチドのアミノ酸配列分析によって明らかにされたアミノ末端から17残基までの配列と5残基目および17残基目のアミノ酸のみが異なる類似したアミノ酸配列をコードするようなフレームが存在する。しかし、ヒトGPR8リガンド前駆体の場合と同様に、その5'上流側にはタンパク質翻訳の開始コドンであると予想されるATGが存在しない。しかし、ヒトGPR8リガンド前駆体タン
- 25 パク質において推測されたように、ブタあるいはラットのGPR8リガンドホモログの前駆体タンパク質との比較からこれらの前駆体タンパク質における開始コドンと予想されるATGにほぼ対応する位置に存在するCTGコドンを開始コドンと仮定し、マウスGPR8リガンド前駆体タンパク質の配列を推定した。この仮想的マウスGPR8リガンド前駆体タンパク質のアミノ酸配列を配列番号：90に

- 示した。マウスGPR8リガンドのアミノ酸配列と予想される配列のカルボキシ末端側にはGPR8リガンドペプチドのヒト、ブタあるいはラットホモログ前駆体タンパク質の場合と同様に、通常の生理活性ペプチドが切り出されると考えられるArg-Argの配列 (Seidah, N. G. et al., Ann. N. Y. Acad. Sci., 839巻、9-24頁、1998年) が2ヶ所存在した。これらのことから、GPR8リガンドペプチドのマウスホモログのアミノ酸配列は配列番号：91および92のいずれかもしくは両方であると推定された。なお、配列番号：91の23残基型マウスGPR8リガンドのアミノ酸配列は、23残基型ラットGPR8リガンドのアミノ酸配列 (配列番号：73) と一致している。仮想的マウスGPR8リガンド前駆体タンパク質のアミノ酸配列およびDNA配列を図9に示した。

参考例42 ラクトパーオキシダーゼ法を用いた [125 I-Tyr 2]-hGPR8L (1-23) および [125 I-Tyr 10]-hGPR8L (1-23) の作製

- DMSO 5 μ l に溶かしたhGPR8L (1-23) (配列番号：16で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド) 1 nmol を0.1 M 塩化ニッケル5 μ l と混合し、0.1 M HEPES (pH 7) に溶かした0.001% 過酸化水素水 10 μ l、0.1 M HEPES (pH 7) に溶かしたラクトパーオキシダーゼ (シグマ社) 10 μ g/ml を10 μ l および [125 I] NaI 37 MBq (NENライフサイエンスプロダクツ社) 10 μ l を混合後、室温で60分反応し、以下の条件でHPLC分取した。

- 用いたカラムは、ODS-80TM (4.6 mm x 15 cm) (トーソー社)、溶出液Aとして10% アセトニトリル/0.1% TFA、溶出液Bとして60% アセトニトリル/0.1% TFAを用い、0-0 (2 min)、0-30 (3 min)、30-38 (5 min)、38-43 (55 min) %B/A+Bのグラディエント溶出法を行なった。流速は1 mL/min、カラム温度は25℃、検出は220nmの吸光度を用いて行った。

- hGPR8L (1-23) には、チロシン残基が2つ存在するので、ヨード化によって、[125 I-Tyr 2]-hGPR8L (1-23) および [125 I-Tyr 10]-hGPR8L (1-23) が生成する。このHPLC条件では、hGPR8L (1-23) が24分、[125 I-Tyr 2]-hGPR8L (1-23) が30分、[125 I-Tyr 10]-hGPR8L (1-23) が32分付近に溶出した。

参考例 4 3 $[^{125}\text{I}]\text{-Tyr}^{10}\text{-hGPR8L (1-23)}$ を用いた受容体結合実験

参考例 4 2 に記載したように作製した $[^{125}\text{I}]\text{-hGPR8L (1-23)}$ および参考例 6 に記載した方法と同様にしてヒト GPR 8 発現 CHO 細胞から調製した細胞膜画分を用いて受容体結合実験を行なった。

- 5 ヒト GPR 8 発現 CHO 細胞から調製した細胞膜画分を、アッセイ用バッファー (25 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA (エチレンジアミン四酢酸)、0.05% CHAPS (3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパン硫酸)、0.1% BSA (ウシ血清アルブミン)、0.25 mM PMSF (フェニルメタンシルホニルフルオリド)、1 $\mu\text{g/ml}$ ペプスタチン、20 $\mu\text{g/ml}$ ロイペプチン、pH 7.4) で各種濃度
- 10 に希釈後、ポリプロピレン製試験管 (Falcon 2053) に 200 μl ずつ分注した。最大結合量 (TB) を測定するために 2 μl の DMSO と 7 nM の $[^{125}\text{I}]\text{-Tyr}^7\text{-hGPR8L (1-23)}$ または $[^{125}\text{I}]\text{-Tyr}^{10}\text{-hGPR8L (1-23)}$ 2 μl を膜画分溶液に添加した。また、非特異的結合 (NSB) を測定するために 100 μM hGPR8L (1-23) の DMSO 溶液 2 μl と 7 nM の $[^{125}\text{I}]\text{-Tyr}^7\text{-hGPR8L (1-23)}$ または $[^{125}\text{I}]\text{-Tyr}^{10}\text{-hGPR8L (1-23)}$ 2 μl を膜画分溶液に添加し
- 15 た。25 $^{\circ}\text{C}$ で 60 分間反応させた後、ポリエチレンイミン処理したワットマングラスフィルター (GF-F) を用いて反応液を吸引ろ過した。ろ過後、 γ -カウンターを用いてろ紙上に残った放射活性を測定し、最大結合量から非特異的結合量を引いて特異的結合量 (SB) を見積もった。 $[^{125}\text{I}]\text{-Tyr}^7\text{-hGPR8L (1-23)}$ を用いた場合に比べて $[^{125}\text{I}]\text{-Tyr}^{10}\text{-hGPR8L (1-23)}$ を用いた方が、特異的結合量が 2 倍多かったので実際
- 20 の結合実験には $[^{125}\text{I}]\text{-Tyr}^{10}\text{-hGPR8L (1-23)}$ を用いた。膜画分の濃度を変化させると膜画分の濃度に依存した $[^{125}\text{I}]\text{-Tyr}^{10}\text{-hGPR8L (1-23)}$ の特異的な結合が認められた。また、膜画分濃度を 5 $\mu\text{g/ml}$ に設定して阻害率 (%) から hGPR8L (1-23) の 50% 阻害濃度 (IC_{50} 値) を算出したところ、 IC_{50} 値は 0.25 nM であった。図 10 に種々の濃度における hGPR8L (1-23) の結合阻害を示す。

25

参考例 4 4 ヒト GPR 8 ligand (1-23) 酸化体: Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met (O)-Gly-Leu (配列番号: 95) の製造

参考例 1 2 の化合物 0.45 mg を 50% 酢酸水 0.5 ml に溶解後、0.3% 過酸化水素

133

水0.05 mlを加え、室温にて8時間放置した。減圧濃縮後SepPakにより精製し、白色粉末0.443 mgを得た。

質量分析による $(M+H)^+$: 2599.2 (計算値2599.4)

HPLC溶出時間: 19.1 分

5 溶出条件

カラム: Wakosil-II 5C18HG (4.6 x 100 mm)

溶離液: A液: 0.1%TFA-水、B液: 0.1%TFA含有アセトニトリルを用い、A/B: 10/0~0/70へ直線型濃度勾配溶出 (35分)

流速: 1.0 ml/分

10

参考例45 ヒトGPR8 ligand (1-22): Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly (配列番号: 96) の製造

市販 2-chlorotrityl resin (Clt resin, 1.33 mmol/g) にFmoc-Glyを導入したのち参考例13と同様に配列順にアミノ酸の縮合と樹脂からの切り出し、精製を行ない目的物を得た。

参考例46 ヒトGPR8 ligand (1-21): Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met (配列番号: 97) の製造

20 市販2-chlorotrityl resin (Clt resin, 1.33mmol/g)にFmoc-Metを導入したのち参考例13と同様に配列順にアミノ酸の縮合と樹脂からの切り出し、精製を行ない目的物を得た。

参考例47 ヒトGPR8 ligand (1-20): Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu (配列番号: 98) の製造

25 市販2-chlorotrityl resin (Clt resin, 1.33mmol/g)にFmoc-Leuを導入したのち参考例13と同様に配列順にアミノ酸の縮合と樹脂からの切り出し、精製を行ない目的物を得た。

質量分析による M^+ : 2282.8 (計算値2282.6)

HPLC溶出時間：17.2 分

溶出条件

カラム：Wakosil-II 5C18HG (4.6 x 100 mm)

溶離液：A液：0.1%TFA-水、B液：0.1%TFA含有アセトニトリルを用い、A/B：10

5 0/0～0/70へ直線型濃度勾配溶出 (35分)

流速：1.0 ml/分

参考例 48 ヒトGPR8 ligand (1-19) : Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu (配列番号：99) の製造

10 市販2-chlorotrityl resin (Clt resin, 1.33mmol/g) にFmoc-Leuを導入したのち参考例 13と同様に配列順にアミノ酸の縮合と樹脂からの切り出し、精製を行ない目的物を得た。

質量分析による M^+ :2169.6 (計算値2169.5)

HPLC溶出時間：16.4 分

15 溶出条件

カラム：Wakosil-II 5C18HG (4.6 x 100 mm)

溶離液：A液：0.1%TFA-水、B液：0.1%TFA含有アセトニトリルを用い、A/B：10

0/0～0/70へ直線型濃度勾配溶出 (35分)

流速：1.0 ml/分

20

参考例 49 ヒトGPR8 ligand (1-18) : Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly (配列番号：100) の製造

市販2-chlorotrityl resin (Clt resin, 1.33mmol/g) にFmoc-Glyを導入したのち参考例 13と同様に配列順にアミノ酸の縮合と樹脂からの切り出し、精製を行ない目的物を得た。

25

質量分析による M^+ :2056.8 (計算値2056.3)

HPLC溶出時間：14.2 分

溶出条件

カラム：Wakosil-II 5C18HG (4.6 x 100 mm)

溶離液：A液：0.1%TFA-水、B液：0.1%TFA含有アセトニトリルを用い、A/B：10/0～0/70へ直線型濃度勾配溶出(35分)

流速：1.0 ml/分

- 5 参考例50 ヒトGPR8 ligand (1-17) : Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala (配列番号：101) の製造

市販2-chlorotrityl resin (Clt resin, 1.33mmol/g) にFmoc-Alaを導入したのち参考例13と同様に配列順にアミノ酸の縮合と樹脂からの切り出し、精製を行ない目的物を得た。

10

- 参考例51 ヒトGPR8 ligand (1-16) : Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala (配列番号：102) の製造

市販2-chlorotrityl resin (Clt resin, 1.33mmol/g) にFmoc-Alaを導入したのち参考例13と同様に配列順にアミノ酸の縮合と樹脂からの切り出し、精製を行ない目的物を得た。

15

- 参考例52 ブタGPR8 ligand (1-23) : Trp-Tyr-Lys-His-Thr-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu (配列番号：56) の製造

- 20 市販2-chlorotrityl resin (Clt resin, 1.33mmol/g) にFmoc-Leuを導入したのち参考例13と同様に配列順にアミノ酸の縮合と樹脂からの切り出し、精製を行ない目的物を得た。

質量分析による $(M+H)^+$: 2585.2 (計算値2585.4)

HPLC溶出時間：20.2 分

- 25 溶出条件

カラム：Wakosil-II 5C18HG (4.6 x 100 mm)

溶離液：A液：0.1%TFA-水、B液：0.1%TFA含有アセトニトリルを用い、A/B：10/0～0/70へ直線型濃度勾配溶出(35分)

流速：1.0 ml/分

参考例 5 3 ラット/マウス GPR8 ligand (1-23) : Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ser-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu の製造
(配列番号 : 7 3 および配列番号 : 9 1)

- 5 参考例 5 2 と同様に配列順にアミノ酸の縮合と樹脂からの切り出し、精製を行ない目的物を得ることができる。

- 参考例 5 4 ブタ GPR8 ligand (1-23) 酸化体 : Trp-Tyr-Lys-His-Thr-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met (0) -Gly-Leu (配列番号 : 1 0 3) の製造

参考例 5 2 の化合物を用い参考例 4 4 と同様に酸化して目的物を得た。

質量分析による $(M+H)^+$: 2601.3 (計算値 2601.4)

HPLC 溶出時間 : 18.9 分

溶出条件

- 15 カラム : Wakosil-II 5C18HG (4.6 x 100 mm)

溶離液 : A液 : 0.1%TFA-水、B液 : 0.1%TFA含有アセトニトリルを用い、A/B : 10

0/0~0/70へ直線型濃度勾配溶出 (35分)

流速 : 1.0 ml/分

- 20 参考例 5 5 ラット/マウス GPR8 ligand (1-23) 酸化体 : Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ser-Gly-Leu-Leu-Met (0) -Gly-Leu (配列番号 : 1 0 4) の製造

参考例 5 3 の化合物を用い参考例 4 4 と同様に酸化して目的物を得ることができる。

25

参考例 5 6 $[N^{\alpha}$ -Acetyl-Trp]-ヒト GPR8 ligand (1-23) : Ac-Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu (配列番号 : 1 0 6) の製造

参考例 1 2 で調製した樹脂の Fmoc 基を除去、無水酢酸でアセチル化した後

、TFA / thioanisole / m-cresol / triisopropylsilane / ethanedithiol (85 / 5 / 5 / 2.5 / 2.5) で処理し樹脂からの切り出しと側鎖保護基の除去を同時に行った。粗ペプチドを参考例 12 と同様の方法で精製し目的物を得た。

質量分析による $(M+H)^+$ 2626.12625.8 (計算値2627.12626.1)

5 HPLC 溶出時間 21.4 分

溶出条件

カラム Wakosil-II 5C18 HG (4.6 x 100mm)

溶離液 A液: 0.1%TFA-水、B液: 0.1%TFA含有アセトニトリルを用い、A/B: 100 / 0 ~ 30 / 70へ 直線型濃度勾配溶出 (35分)

10 流速 1.0ml/分

参考例 57 ヒトGPR8 ligand (2-23) : Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu (配列番号: 107) の製造

- 15 参考例 12 と同様に所望のアミノ酸配列を樹脂に導入した。最後のTyrを導入後樹脂から切り出す前にFmoc基を樹脂上で除去したのち、TFA / thioanisole / m-cresol / triisopropylsilane / ethanedithiol (85 / 5 / 5 / 2.5 / 2.5) で処理し樹脂からの切り出しと側鎖保護基の除去を同時に行った。粗ペプチドを参考例 12 と同様の方法で精製し目的物を得た。

20 質量分析による $(M+H)^+$ 2397.1 (計算値2397.3)

HPLC 溶出時間 19.9 分

溶出条件

カラム Wakosil-II 5C18 HG (4.6 x 100mm)

溶離液 A液: 0.1%TFA-水、B液: 0.1%TFA含有アセトニトリルを用い、A/B: 100 / 0 ~ 30 / 70へ 直線型濃度勾配溶出 (35分)

25 流速 1.0ml/分

参考例 58 ヒトGPR8 ligand (4-23) : His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu (配列番号: 108) の製造

参考例 12と同様に所望のアミノ酸配列を樹脂に導入した。最後のHisを導入後樹脂から切り出す前にFmoc基を樹脂上で除去したのち、TFA / thioanisole / m-cresol / triisopropylsilane / ethanedithiol (85 / 5 / 5 / 2.5 / 2.5)で処理し樹脂からの切り出しと側鎖保護基の除去を同時に行った。粗ペプチドを参

- 5 考例 12と同様の方法で精製し目的物を得た。

質量分析による (M+H)⁺ 2106.0 (計算値2106.1)

HPLC溶出時間 20.0 分

溶出条件

カラム Wakosil-II 5C18 HG (4.6 x 100mm)

- 10 溶離液 A液: 0.1%TFA-水、B液: 0.1%TFA含有アセトニトリルを用い、A/B: 100 / 0 ~ 30 / 70へ 直線型濃度勾配溶出(35分)

流速 1.0ml/分

参考例 59 ヒトGPR8 ligand (9-23): Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-

- 15 -Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu (配列番号: 109) の製造

参考例 12と同様に所望のアミノ酸配列を樹脂に導入した。最後のArgを導入後樹脂から切り出す前にFmoc基を樹脂上で除去したのち、TFA / thioanisole / m-cresol / triisopropylsilane / ethanedithiol (85 / 5 / 5 / 2.5 / 2.5)で処理し樹脂からの切り出しと側鎖保護基の除去を同時に行った。粗ペプチドを参

- 20 考例 12と同様の方法で精製し目的物を得た。

質量分析による (M+H)⁺ 1615.0 (計算値1614.9)

HPLC溶出時間 20.2 分

溶出条件

カラム Wakosil-II 5C18 HG (4.6 x 100mm)

- 25 溶離液 A液: 0.1%TFA-水、B液: 0.1%TFA含有アセトニトリルを用い、A/B: 100 / 0 ~ 30 / 70へ 直線型濃度勾配溶出(35分)

流速 1.0ml/分

参考例 60 ヒトGPR8 ligand (15-23): Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Le

u (配列番号: 110) の製造

- 参考例12と同様に所望のアミノ酸配列を樹脂に導入した。最後のArgを導入後樹脂から切り出す前にFmoc基を樹脂上で除去したのち、TFA / thioanisole / m-cresol / triisopropylsilane / ethanedithiol (85 / 5 / 5 / 2.5 / 2.5) で処理し樹脂からの切り出しと側鎖保護基の除去を同時に行った。粗ペプチドを参考例12と同様の方法で精製し目的物を得た。

質量分析による (M+H)⁺ 901.4 (計算値901.5)

HPLC溶出時間 20.2 分

溶出条件

- 10 カラム Wakosil-II 5C18 HG (4.6 x 100mm)
溶離液 A液: 0.1%TFA-水、B液: 0.1%TFA含有アセトニトリルを用い、A/B: 100 / 0 ~ 30 / 70へ 直線型濃度勾配溶出 (35分)
流速 1.0ml/分

- 15 参考例61 [N-Acetyl-Tyr²]-ヒトGPR8 ligand (2-23): Ac-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu (配列番号: 111) の製造

参考例57で調製した樹脂を無水酢酸でアセチル化した後、参考例57と同様に処理、精製し目的物を得た。

- 20 質量分析による (M+H)⁺ 2439.3 (計算値2439.3)

HPLC溶出時間 20.2 分

溶出条件

- カラム Wakosil-II 5C18 HG (4.6 x 100mm)
溶離液 A液: 0.1%TFA-水、B液: 0.1%TFA含有アセトニトリルを用い、A/B: 100 / 0 ~ 30 / 70へ 直線型濃度勾配溶出 (35分)
流速 1.0ml/分

参考例62 [D-Trp¹]-ヒトGPR8 ligand (1-23): D-Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu (配列

番号：112)の製造

参考例12のFmoc-Trp(Boc)の代りにFmoc-D-Trp(Boc)を用い同様に目的物を得た。

質量分析による(M+H)⁺ 2583.4 (計算値2583.4)

5 HPLC溶出時間 20.6分

溶出条件

カラム Wakosil-II 5C18 HG (4.6 x 100mm)

溶離液 A液: 0.1%TFA-水、B液: 0.1%TFA含有アセトニトリルを用い、A/B: 100 / 0 ~ 30 / 70へ 直線型濃度勾配溶出(35分)

10 流速 1.0ml/分

参考例63 [N-3-Indolepropanoyl-Tyr⁷]-ヒトGPR8 ligand (2-23): 3-Indolepropanoyl-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu (配列番号: 113)の製造

15 参考例12のFmoc-Trp(Boc)の代りに3-Indolepropionic acidを用い所望の樹脂を得、これをTFA / thioanisole / m-cresol / triisopropylsilane / ethane dithiol (85 / 5 / 5 / 2.5 / 2.5)で処理し樹脂からの切り出しと側鎖保護基の除去を同時に行った。粗ペプチドを参考例12と同様の方法で精製し目的物を得た。

20 質量分析による(M+H)⁺ 2568.4 (計算値2568.4)

HPLC溶出時間 21.7分

溶出条件

カラム Wakosil-II 5C18 HG (4.6 x 100mm)

25 溶離液 A液: 0.1%TFA-水、B液: 0.1%TFA含有アセトニトリルを用い、A/B: 100 / 0 ~ 30 / 70へ 直線型濃度勾配溶出(35分)

流速 1.0ml/分

参考例64 GPR8発現CHO細胞膜画分を用いて測定したGPR8リガンドペプチドのヒトおよびブタホモログの誘導体のGTPγS結合促進活性

- 本明細書に合成法を記載したGPR8リガンドペプチドのヒトおよびブタホモログの誘導体を種々の濃度で参考例6に記載した方法でGPR8発現CHO細胞膜画分に投与してGTP γ S結合促進活性を測定した。測定した誘導体の配列番号とGTP γ S結合促進活性を表1に示した。なお、活性は50%有効濃度 (EC₅₀ 5 値) で示した。また、参考例20および21に記載のhGPR8L (1-23) およびhGPR8L (1-30) のGTP γ S結合促進活性も合わせて記載した。

- 参考例65 GPR8発現CHO細胞膜画分および [¹²⁵I-Tyr¹⁰]-hGPR8L (1-23) を用いて測定したGPR8リガンドペプチドのヒトおよびブタホモログの誘導体の 10 受容体結合活性

- 本明細書に合成法を記載したGPR8リガンドペプチドのヒトおよびブタホモログの誘導体の受容体結合活性を参考例43に記載した方法でGPR8発現CHO細胞膜画分および [¹²⁵I-Tyr¹⁰]-hGPR8L (1-23) を用いて測定した。測定した誘導体の配列番号と受容体結合活性を表1に示した。なお、受容体結合活性は50%結合 15 阻害濃度 (IC₅₀値) で示した。また、参考例43に記載のhGPR8L (1-23) の受容体結合活性も合わせて記載した。

表 1

PR8リガンドペプチドのヒトおよびブタホモログの誘導体のGTP γ S結合促進活性
および受容体結合活性

誘導体	配列番号	GTP γ S結合促進活 性 (EC ₅₀ nM)	受容体結合活性 (IC ₅₀ nM)
hGPR8L (1-23)	16	1.6	0.25
hGPR8L (1-30)	17	0.57	0.025
[Met (O)]-hGPR8L (1-23)	95	1.4	0.31
Fmoc-hGPR8L (1-23)	105	240	0.20
Ac-hGPR8L (1-23)	106	14	2.4
[D-Trp ¹]-hGPR8L (1-23)	112	7.1	0.82
hGPR8L (2-23)	107	3900	160
Ac-hGPR8L (2-23)	111	7200	420
IndPr-hGPR8L (2-23)	113	5.0	0.28
hGPR8L (4-23)	108	6700	1400
hGPR8L (9-23)	109	4200	1300
hGPR8L (1-20)	98	0.86	0.20
hGPR8L (1-19)	99	1000	100
hGPR8L (1-18)	100	>10000	2700
pGPR8L (1-23)	56	1.5	0.38
[Met (O)]-pGPR8L (1-23)	103	0.73	0.29

5

参考例 6 6 ラット全脳由来Gタンパク質共役型レセプタータンパク質をコード
するcDNAのクローニングと塩基配列の決定

ラット全脳cDNA (CLONTECH) を鋳型とし、ヒトGPR8をコードするDNA
の塩基配列を元に設計した2個のプライマー、プライマー1 (配列番号: 128
10) およびプライマー2 (配列番号: 129) を用いてPCR反応を行った。該反
応における反応液の組成は、上記cDNAを10分の1量鋳型として使用し、Advan
tage-2 cDNA Polymerase Mix (CLONTECH) 1/50量、プライマー3 0.2 μ M、プライ
マー2 0.2 μ M、dNTPs 200 μ M、および酵素に添付のバッファーを加え、25 μ lの
15 液量とした。PCR反応は、(i) 94 $^{\circ}$ C・2分の後、(ii) 94 $^{\circ}$ C・20秒、72 $^{\circ}$ C・2
分のサイクルを3回、(iii) 94 $^{\circ}$ C・20秒、66 $^{\circ}$ C・20秒、68 $^{\circ}$ C・2分のサイクルを3
回、(iv) 94 $^{\circ}$ C・20秒、60 $^{\circ}$ C・20秒、68 $^{\circ}$ C・2分のサイクルを36回繰り返し、最後

- に68℃・7分の伸長反応を行った。該PCR反応後の反応産物を、TAクローニングキット (Invitrogen) の処方に従い、プラスミドベクターpCR2.1-TOPO (Invitrogen) ヘサブクローニングした。これを大腸菌DH5 α に導入し、アンピシリンを含むLB寒天培地中で、cDNAを持つクローンを選択した。個々のクローンの配列を解析した結果、新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードするcDNAの塩基配列 (配列番号: 127) を得た。このDNAの塩基配列がコードするアミノ酸配列 (配列番号: 126) を含有する新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質をTGR26と命名した (本明細書中、ラットTGR26とも称する)。
- 10 配列番号: 126で表されるアミノ酸配列は、既知のヒトGタンパク質共役型レセプタータンパク質であるGPR7 [ゲノミクス (Genomics), 28巻, 84-91頁, 1995年] との間に84.8%の相同性を有していた。
- TGR26をコードするDNAを挿入したプラスミドを有する前述した形質転換体から1クローンを選択し、アンピシリンを含むLB培地で振とう培養し、プラスミドを得た。これを制限酵素ClaIおよびSpeIで処理し、TGR26をコードするインサート部分を切り出した。同様に制限酵素ClaIおよびSpeIで処理したpAKK0-1.11HおよびLigation Express Kit (CLONTECH) を用いて連結し、大腸菌DH10Bにエレクトロポレーション法にて導入した。得られたクローンについては、有する発現細胞構築用プラスミドの構造を、制限酵素処理および配列解析で確認したうえ、大腸菌 (*Escherichia coli*) DH10B/pAK-rGPR7と命名した。
- 20 TGR26の疎水性プロット図を [図11] に示す。

参考例67 TGR26発現CHO細胞の作製

- 参考例66に記載の発現プラスミドpAK-rGPR7で形質転換した*Escherichia coli* DH5 α (東洋紡) を培養後、Plasmid Midi Kit (キアゲン) を用いてpAK-rGPR7プラスミドDNAを調製した。これをCellPect Transfection Kit (アマシャムファルマシアバイオテク) を用いて、添付のプロトコールに従ってCHO dhfr細胞に導入した。5 μ gのDNAをリン酸カルシウムとの共沈懸濁液とし、48時間前に3 $\times 10^5$ 個のCHO dhfr細胞を播種した直径6cmシャーレ2枚に添加した。10%ウシ胎
- 25

児血清を含むMEM α 培地で1日間培養した後、継代し、選択培地である10%透析ウシ胎児血清を含む核酸不含MEM α 培地で培養した。選択培地中に増殖してくるTGR 26発現CHO細胞である形質転換細胞のコロニー44クローンを選択した。

5 参考例68 TaqMan PCR法を用いたTGR 26発現CHO細胞株のTGR 26発現量の定量

- 参考例67で得たTGR 26発現CHO細胞株44クローンを、各25cm²フラスコに培養し、RNeasy Mini Kits (キアゲン) を用いてtotal RNAを調製した後、RNAse-free DNase Set (キアゲン) を用いてDNase処理をした。得られたtotal RNA
- 10 4 μ gをランダムプライマー (宝酒造) 500pmolを含む溶液12 μ lとして70℃で10分間処理した後氷冷し、さらに1xFirst Strand Buffer、10 mM DTT、500 μ M dA/dC/dG/dTTPおよび200 units SUPERScript II (ギブコ) を添加し、混合液20 μ lを、30℃・10分、42℃・60分、51℃・30分、70℃・15分で処理することにより逆転写反応を行なった。得られたtotal RNA 5ng相当の逆転写産物、または後に述べるよ
- 15 うにして作製した10⁶~1⁷コピーの標準cDNA、1xUniversal PCR Master Mix (PEバイオシステムズ)、配列番号: 130で表されるプライマーおよび配列番号: 131で表されるプライマー各100nM、および配列番号: 140 (Fam-tctgtctg gacaccgtac cacctga-Tamra; 配列中、Famは6-carboxy-fluoresceinを、Tamraは6-carboxy-tetramethyl-rhodamineを、それぞれ示す。) で表されるTaqMan
- 20 プローブ 100nMを含む反応混合液25 μ lについてABI PRISM 7700 Sequence Detector (PEバイオシステムズ) を用いてPCRを行なった。PCRは、50℃・2分、95℃・10分で処理後、95℃・15秒、60℃・60秒のサイクルを40回繰り返すことにより行なった。

- 標準cDNAは、100pgのTGR26発現プラスミドDNA (pAK-rGPR7)、配列番号
- 25 : 130で表されるプライマーおよび配列番号: 131で表されるプライマー各500nM、1xPCR Gold Buffer、2.5mM MgCl₂、200 μ M dA/dC/dG/dTTPおよび20units AmpliTaq Gold (PEバイオシステムズ) を含む反応混合液200 μ lを、GeneAmp PCR System 9700 (PEバイオシステムズ) を用いて、95℃・10分で処理後、95℃・10秒、63℃・15秒、72℃・10秒のサイクルを40回繰り返す条件のPCRを行なって増幅

して調製した。QIAquick PCR Purification Kit (キアゲン) を用いて精製した合成 cDNA の 260nm の吸光度を測定して濃度を算出し、さらに標準 cDNA の正確なコピー数を算出した後、1mM EDTA を含む 10mM Tris-HCl (pH8.0) 溶液で希釈し、 1×10^8 コピー/ μ l の濃度の標準 cDNA 溶液を調製した。また、TaqMan PCR 用プロ
5 ローブおよびプライマーは Primer Express (Version 1.0) (PE バイオシステムズ) により設計した。

発現量は ABI PRISM 7700 SDS ソフトウェアによって算出した。リポーターの蛍光強度が設定された値に達した瞬間のサイクル数を縦軸にとり、標準 cDNA の初期濃度の対数値を横軸にとり、標準曲線を作成した。標準曲線より各逆転写産
10 物の初期濃度を算出し、各クローンの total RNA 当たりの TGR 26 遺伝子発現量を求めた。その結果、TGR 26 発現 CHO 細胞株クローン番号 18 および 28 が高い発現量を示すことがわかった。以後の実験にはこれら 2 つのクローンの発現細胞を用いた。

15 参考例 69 TGR 26 発現 CHO 細胞を用いた細胞内 cAMP 産生量の測定

参考例 68 で作製した TGR 26 発現 CHO 細胞を 24 穴プレートに 5×10^4 cell/well で播種し、48 時間培養した。細胞を 0.2mM 3-イソブチル-メチルキサンチン、0.05% BSA (ウシ血清アルブミン) および 20mM HEPES を含む MEM α バッファー (pH7.4) で洗浄した [以下、0.2mM 3-イソブチル-メチルキサンチン、0.05% BSA
20 および 20mM HEPES を含む MEM α バッファー (pH7.4) を、反応用バッファーと呼ぶ]。その後、0.5ml の反応用バッファーを加えて 30 分間培養器で保温した。反応用バッファーを除き、新たに 0.25ml の反応用バッファーを細胞に加えた後、適当な濃度の DMSO 溶液とした試料と 2 μ M フォルスコリンを含む 0.25ml の反応用バッファーを細胞に加え、37℃ で 30 分間反応させた。100 μ l の 20% 過塩素酸を加えて反応
25 を停止させ、次に氷上で 1 時間置くことにより細胞内 cAMP を抽出した。抽出液中の cAMP 量は cAMP EIA キット (アマシャムファルマシアバイオテック) を用いて測定した。

参考例 70 TGR 26 発現 CHO 細胞膜面分を用いて測定した 23 残基または 30

残基のGPR8リガンドペプチドヒトホモログの細胞内cAMP産生抑制活性

参考例で得られた23残基のGPR8リガンドペプチドヒトホモログ（以下、hGPR8L（1-23）と記載することがある）または参考例で得られた30残基のGPR8リガンドペプチドヒトホモログ（以下、hGPR8L（1-30）と記載することがある）

- 5 を、種々の濃度で参考例69に記載した方法でTGR26発現CHO細胞膜画分に投与し、細胞内cAMP産生抑制活性を測定した。

結果を〔図12〕に示す。

これより明らかに、hGPR8L（1-23）およびhGPR8L（1-30）は濃度依存的にTGR26発現CHO細胞細胞内cAMPの産生を抑制した。

- 10 図中、cAMP合成抑制活性は、フォルスコリンを含む反応用バッファーを添加したときの細胞内cAMP量から反応用バッファーを添加したときの細胞内cAMP量を減じた量を100%として、hGPR8L（1-23）またはhGPR8L（1-30）を加えたときの細胞内cAMP量から反応用バッファーを添加したときの細胞内cAMP量を減じた量を%として表わした。

- 15 これより、hGPR8L（1-23）またはhGPR8L（1-30）が、TGR26に対するリガンドであることが明らかとなった。

hGPR8L（1-23）のブタ、ラットおよびマウスのホモログおよびhGPR8L（1-30）のブタ、ラットおよびマウスのホモログを用いても、上記と同様に、濃度依存的にTGR26発現CHO細胞細胞内cAMPの産生抑制を確認できる。

20

参考例71 TGR26発現CHO細胞の膜画分を用いたGTP γ S結合活性の測定

TGR26発現CHO細胞膜画分に対する^[35S]-guanosine 5'-(γ -thio) triphosphate (GTP γ S) の結合促進活性を以下の方法により測定した。

- 25 1) 膜画分の調製法

1x10⁸個のTGR26発現CHO細胞に10mlのホモジネートバッファー（10mM NaHCO₃、5mM EDTA、0.5mM PMSF（フェニルメチルスルホニルフルオリド）、1 μ g/ml ペプスタチン、4 μ g/ml E-64、20 μ g/ml ロイペプチン）を添加し、ポリトロン（12,000rpm、1分間）を用いて破碎した。細胞破碎液を遠心（1,000g、1

5分間)して上清を得た。次にこの上清を超遠心分離(Beckman type 30ローター、30,000rpm、1時間)し、得られた沈殿物をTGR 26発現CHO細胞膜画分とした。

2) GTP γ S結合活性の測定

- 5 TGR 26発現CHO細胞膜画分を膜希釈緩衝液(50mM トリス塩酸緩衝液(pH7.4)、5 mM MgCl₂、150mM NaCl、1 μ M GDP、0.1% BSA)で希釈して、タンパク質濃度30 μ g/mlのアッセイ用細胞膜画分溶液を調製した。アッセイ用膜画分溶液200 μ lに、50nM濃度の[³⁵S]-guanosine 5'-(γ -thio)triphosphate(NEN社)を2 μ lと適当な濃度のDMSO溶液とした試料2 μ lとを添加し、この混合液を25℃で1時間保温した。混合液をフィルター濾過し、さらにフィルターを洗浄用バッファー(50mM トリス塩酸緩衝液(pH7.4)、5mM MgCl₂、1mM EDTA、0.1% BSA) 1.5mlで2回洗浄した後、フィルターの放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。
- 10

- 15 参考例72 TGR 26発現CHO細胞膜画分を用いて測定した23残基または30残基のGPR 8リガンドペプチドヒトホモログのGTP γ S結合促進活性 hGPR 8L(1-23)またはhGPR 8L(1-30)を種々の濃度で、参考例71に記載した方法に従い、TGR26発現CHO細胞膜画分と混合し、GTP γ S結合促進活性を測定した。

- 20 結果を[図13]に示す。

これより明らかに、hGPR 8L(1-23)およびhGPR 8L(1-30)は濃度依存的にTGR 26発現CHO細胞膜画分のGTP γ S結合を促進した。

- hGPR 8L(1-23)のブタ、ラットおよびマウスホモログおよびhGPR 8L(1-30)のブタ、ラットおよびマウスホモログを用いても、上記と同様に、濃度依存的にTGR 26発現CHO細胞膜画分のGTP γ S結合促進を確認できる。
- 25

参考例73 [¹²⁵I-Tyr¹⁰]-hGPR 8L(1-23)を用いたレセプ

ター結合実験

参考例42に記載した方法により作製した $[^{125}\text{I}-\text{Tyr}^{10}] - \text{hGPR8L} (1-23)$ および参考例71に記載したTGR26発現CHO細胞から調製した細胞膜画分を用いて以下のようにしてレセプター結合実験を行なった。

- 5 TGR26発現CHO細胞から調製した細胞膜画分を、アッセイ用バッファー (25 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 0.05% CHAPS (3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパン硫酸)、0.1% BSA, 0.5 mM PMSF、 $1\mu\text{g/ml}$ ペプスタチン、 $20\mu\text{g/ml}$ ロイペプチン、 $4\mu\text{g/ml}$ E-64, pH 7.4) で各種濃度に希釈後、ポリプロピレン製試験管 (Falcon 2053) に $200\mu\text{l}$ ずつ分注した。最大結合量を測定するために $2\mu\text{l}$ のDMSOと7 nMの $[^{125}\text{I}-\text{Tyr}^{10}] - \text{hGPR8L} (1-23)$ $2\mu\text{l}$ を膜画分溶液に添加した。また、非特異的結合を測定するために $100\mu\text{M}$ hGPR8L (1-23) のDMSO溶液 $2\mu\text{l}$ と7 nMの $[^{125}\text{I}-\text{Tyr}^{10}] - \text{hGPR8L} (1-23)$ $2\mu\text{l}$ を膜画分溶液に添加した。25℃で75分間反応させた後、ポリエチレンイミン処理したワットマンガラスフィルター (GF-F) を用いて反応液を吸引ろ過しさらにフィルターを洗浄用バッファー (25 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 0.05% CHAPS, 0.1% BSA, pH 7.4) 1.5 ml で2回洗浄した。ろ過後、 γ -カウンターを用いてろ紙に残った放射活性を測定し、最大結合量から非特異的結合量を引いて特異的結合量を見積もった。
- 20 膜画分の濃度を変化させると膜画分の濃度に依存した $[^{125}\text{I}-\text{Tyr}^{10}] - \text{hGPR8L} (1-23)$ の特異的な結合が認められた。膜画分濃度を $3\mu\text{g/ml}$ に設定してhGPR8L (1-23) およびhGPR8L (1-30) による $[^{125}\text{I}-\text{Tyr}^{10}] - \text{hGPR8L} (1-23)$ のTGR26発現細胞膜画分への特異的結合に対する結合阻害を調べた。阻害率から50%阻害濃度 (IC_{50} 値) を算出したところ、hGPR8L (1-23) の IC_{50} 値は 0.12 nM であった。また、hGPR8L (1-30) の IC_{50} 値は 0.028 nM であった。

これより、hGPR8L (1-23) およびhGPR8L (1-30) がTGR26発現細胞膜画分に対して高い親和性を有することが示された。このことは

、hGPR8L(1-23)およびhGPR8L(1-30)がTGR26レセプターの高親和性リガンドであることを意味するものである。

〔図14〕に種々の濃度におけるhGPR8L(1-23)およびhGPR8L(1-30)の結合阻害を示す。

- 5 hGPR8L(1-23)のラットおよびマウスホモログおよびhGPR8L(1-30)のブタ、ラットおよびマウスホモログを用いても、上記と同様に、 $[^{125}\text{I-Tyr}^{10}]$ -hGPR8L(1-23)のTGR26発現細胞膜画分への特異的結合に対する結合阻害を確認できる。

- 10 参考例74 TGR26発現CHO細胞膜画分および $[^{125}\text{I-Tyr}^{10}]$ -hGPR8L(1-23)を用いて測定したGPR8リガンドペプチドのヒトおよびブタホモログの誘導体のレセプター結合活性

参考例で得られたGPR8リガンドペプチドのヒトおよびブタホモログの誘導体のレセプター結合活性を、参考例73に記載した方法でTGR26発現CHO細胞膜画分および $[^{125}\text{I-Tyr}^{10}]$ -hGPR8L(1-23)を用いて測定した。測定した誘導体とレセプター結合活性を表2に示す。レセプター結合活性は、50%結合阻害濃度(IC_{50} 値)で示した。

表 2

誘導体	受容体結合活性 (IC ₅₀ nM)
[Met (O)]-hGPR8L (1-23)	0.29
Fmoc-hGPR8L (1-23)	0.23
Ac-hGPR8L (1-23)	0.27
[D-Trp ¹]-hGPR8L (1-23)	1.3
hGPR8L (2-23)	240
Ac-hGPR8L (2-23)	570
IndPr-hGPR8L (2-23)	0.12
hGPR8L (4-23)	2000
hGPR8L (9-23)	2500
hGPR8L (1-20)	0.17
hGPR8L (1-19)	9.9
hGPR8L (1-18)	760
pGPR8L (1-23)	0.12
[Met (O)]-pGPR8L (1-23)	0.28

参考例 7 5 マウス TGR 2 6 をコードする cDNA の 5' 上流端のクローニング

- 5 5' RACE PCR クローニングによりマウス TGR 2 6 をコードする cDNA の 5' 上流塩基配列を明らかにした。

5' RACE PCR クローニングは、参考例に記載のマウス脳 cDNA を鋳型として SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit に添付の Universal Primer Mix と配列番号 : 1 3 2 の合成プライマーで PCR 反応を行ない、次にこの PCR 反応液を鋳型としてキットに添付の Nested Universal Primer と配列番号 : 1 3 3 の合成プライマーで PCR 反応を行なうことにより達成された。配列番号 : 1 3 2 および配列番号 : 1 3 3 のプライマーは、Genbank に登録のマウス GPR 7 cDNA 断片配列 (Accession: U23807) を基に設計した。PCR の反応液組成と反応条件は以下のとおりである。反応液はマウス脳 cDNA 1 μl、Universal Primer Mix 2 μl、配列番号 : 1 3 2 の合成 DNA プライマー 0.2 μM、0.8 mM dNTPs、Advantage-GC 2 ポリメラーゼ (CLONTECH) 0.4 μl および酵素に付属のバッファーで総反応量を 20 μl とし、サーマルサイクラー (PE バイオシステムズ) を用

い、96℃・120秒の加熱の後、96℃・30秒、68℃・120秒のサイクルを30回繰り返し、さらに72℃で10分間保温した。次に、キットに添付のTricine-EDTA Bufferで50倍希釈したPCR反応液0.5μl、Nested Universal Primer 0.5μM、配列番号：133の合成DNAプライマー0.5μM、0.8mM dNTPs、Advantage-GC 2ポリメラーゼ (CLONTECH) 0.4μlおよび酵素に付属のバッファーで総反応量を20μlとし、サーマルサイクラー (PEバイオシステムズ) を用い、96℃・120秒の加熱の後、96℃・30秒、60℃・30秒、72℃・60秒のサイクルを30回繰り返し、さらに72℃で10分間保温した。増幅したDNAを1.5%のアガロースゲル電気泳動により分離した後、約450塩基長のDNAをカミソリで切り出し、DNAをQIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン) を用いて回収した。このDNAをTOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) のプロトコールに従ってpCR2.1-TOPOベクターへクローニングした。これをエシェリヒア・コリ (Escherichia coli) TOP10 competent cell (Invitrogen) に導入して形質転換した後、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリンおよびX-galを含むLB寒天培地で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌したつま楊枝を用いて分離し、形質転換体を得た。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、QIAwell 8 Plasmid Kit (キアゲン) を用いてプラスミドDNAを調製した。塩基配列の決定のための反応はBigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PEバイオシステムズ) を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読し、配列番号：134で表される塩基配列を得た。

参考例76 ヒト染色体DNAを用いたPCR法によるヒトGPR7 DNAの増幅

25 ヒト染色体DNAを鋳型として、2種の合成プライマー (配列番号：141および配列番号：142) を用いたPCR法によるDNA増幅を行なった。合成プライマーは受容体タンパク質に翻訳される領域の遺伝子が増幅されるように構築したが、その際に遺伝子の5'側に制限酵素Cla Iの認識する塩基配列が付加され、3'側に制限酵素Spe Iの認識する塩基配列が付加されるように、

- 5'側および3'側にそれぞれの制限酵素の認識配列を付加した。反応液の組成は、ヒト染色体DNA(タカラ) 0.5 μ g、合成DNAプライマー各1 μ M、0.8 mM dNTPs、1 mM $MgCl_2$ 、KODポリメラーゼ(トヨボー) 1 μ lおよび酵素に付属のバッファーで、総反応量は50 μ lとした。
- 5。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー(タカラ)を用い、94℃・60秒の加熱の後、98℃・15秒、65℃・2秒、74℃・30秒のサイクルを35回繰り返した。増幅産物の確認は、0.8%アガロースゲル電気泳動の後、エチジウムブロマイド染色によって行なった。
- 10 参考例77 PCR産物のプラスミドベクターへのサブクローニングおよび挿入DNA部分の塩基配列の解読による増幅DNA配列の確認
- 参考例76で行なったPCR反応液を0.8%の低融点アガロースゲル電気泳動により分離し、バンドの部分をかみそりで切り出した後、細片化、フェノール抽出、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿の操作を行なってDNAを回収した。
- 15。pCR-Script™ Amp SK(+)クローニングキット(ストラタジーン)の処方に従い、回収したDNAをプラスミドベクターpCR-Script Amp SK(+)へサブクローニングした。これをエシェリヒア コリ(*Escherichia coli*) DH5 α competent cell(トヨボー)に導入して形質転換した後、DNA挿入断片を持つクローンをアンピシリン、IPTGおよびX-galを含むLB寒天培地で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌したつま楊枝を用いて分離し、形質転換体*E. coli* DH5 α /GPR7を得た。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、QIAwell 8 Plasmid Kit(キアゲン)を用いてプラスミドDNAを調製した。調製したDNAの一部に対して制限酵素Cla IおよびSpe Iによる切断を行ない、挿入されている受容体DNA断片の大きさを確認した。塩基配列の決定のための反応はDyeDeoxyTerminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems社)を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読した(配列番号: 143)。配列番号: 143で表される塩基配列を有するDNAを保持するpCR-Script Amp SK(+)プラスミドを、pCR-ScriptヒトGPR7と命名した。配列番号: 143で表される塩基配列を有するDNAがコードするヒトGPR7のアミノ酸配列を配列番号: 144に示した。ここで配列を決定したヒトGPR
- 25

- 7のDNA配列は0' Dowdらの報告(0' Dowd, B. F. et al., Genomics, 28巻、84-91頁、1995年)にあるDNA配列とは2塩基が異なっていた。これらは配列番号: 143の893番目および894番目に当たり、0' Dowdらの報告ではそれぞれCおよびGであるが、本参考例ではGおよびCであった。これにより、翻訳されるアミノ酸配列において配列番号: 144の296番目のアミノ酸が、0' Dowdらの報告のThrが本参考例ではSerとなる。

参考例78 ヒトGPR7発現CHO細胞の作製

- 参考例77で配列が確認されたヒトGPR7の全長アミノ酸配列をコードし5'側に
- 10 Cla I認識配列を付加し、また3'側にSpe I認識配列を付加した遺伝子が導入されたプラスミドによって形質転換されたE. coliのクローンからPlasmid Midi Kit (キアゲン)を用いてプラスミドDNAを調製し、これを制限酵素ClaIおよびSpe Iで消化してインサートDNAを切り出した。インサートDNAは電気泳動後、アガロースゲルからカミソリで切り出し、次に細片化、フェノール抽出、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿の操作により回収された。このインサートDNA
- 15 をClaIおよびSpe Iで切断した動物細胞発現用ベクタープラスミドpAKKO-111H (Hinuma, S. et al. Biochim. Biophys. Acta, 1219巻、251-259頁、1994年、記載のpAKKO1.11Hと同一のベクタープラスミド)に加え、T4ライゲース(タカラ)を用いてライゲーションを行ない、タンパク質発現用プラスミドpAKKO-Human GPR7
- 20 を構築した。このプラスミドpAKKO-Human GPR7で形質転換した大腸菌をDH5 α /pAKKO-Human GPR7と命名した。

- pAKKO-Human GPR7で形質転換したE. coli DH5 α (トーヨーボイ)を培養後、Plasmid Midi Kit (キアゲン)を用いてpAKKO-Human GPR7プラスミドDNAを調製した。これをCellPfect Transfection Kit (アマシャムファルマシアバイオテック)
- 25 を用いて、添付のプロトコールに従ってCHO dhfr細胞に導入した。3 μ gのDNAをリン酸カルシウムとの共沈懸濁液とし、24時間前に5 x 10⁵または1 x 10⁶個のCHO dhfr細胞を播種した直径6 cmシャーレに添加した。10%ウシ胎児血清を含むMEM α 培地で1日間培養した後、継代し、選択培地である10%透析ウシ胎児血清を含む核酸不含MEM α 培地で培養した。選択培地中に増殖してくるGPR7発現

CHO細胞である形質転換細胞のコロニー24クローンを選択した。

参考例79 TaqMan PCR法を用いたヒトGPR7発現CHO細胞株のヒトGPR7遺伝子発現量の測定

- 5 参考例78に従って作製したヒトGPR7発現CHO細胞株24クローンを各25 cm² フラスコに培養し、増殖した細胞からISOGEN (ニッポンジーン社) を用いてtotal RNA画分を調製した。このtotal RNA画分に対してMessageClean (Gen Hunter社) キットを用いたDNase I処理を行ない、DNAを含まないtotal RNAを得た。

- Total RNA を鋳型としたcDNA合成は、TaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems 社) キットを用いて行なった。反応液の組成は、DNase I処理したtotal RNA 4μg、ランダムプライマー1μl、25 mM MgCl₂溶液4.4μl、10 mM dNTP mix 2μl、RNase Inhibitor 0.4μl、逆転写酵素0.5μlおよびキットに付属の反応バッファーで、総反応量を20μlとした。逆転写反応はサーマルサイクラー (タカラ) を用いて、25℃・10分、48℃・30分、95℃・5分の条件で行な
15 った。

- 標準ヒトGPR7 DNAは、全長ヒトGPR7 DNAを鋳型としたPCR増幅DNAを精製することにより調製された。PCR反応液の組成は、参考例77に記載のpCR-ScriptヒトGPR7 5pg、合成DNAプライマー (配列番号: 145) 0.5μM、合成DNAプライマー (配列番号: 146) 0.5μM、1.6 mM dNTPs、2.5 mM MgCl₂、LATaqポリメラーゼ (タカラ) 0.5μlおよび酵素に付属のバッファーで、総反応量は50μlとした。増幅のための反応はサーマルサイクラー (Applied Biosystems 社) を用い、94℃・120秒の加熱の後、94℃・30秒、60℃・30秒、72℃・60秒のサイクルを25回繰り返
20 し、最後に72℃・10分間保温した。PCR反応液を0.8%のアガロースゲル電気泳動により分離し、バンドの部分をかみそりで切り出した後、QIAquick PCR Purification Kit (キアゲン) を用いてPCR増幅DNAを回収した。このPCR増幅DNA溶液に混入
25 しているプライマーDNAおよびdNTPsを取り除くため、このDNA溶液をクロモスピンカラム400 (CLONTECH社) ゲルクロマトグラフィーに供し、増幅ヒトGPR7 DNA溶出画分を得た。この増幅ヒトGPR7 DNA溶液の260 nmの吸収から計算されたDNA量と増幅ヒトGPR7 DNA塩基組成から、本増幅ヒトGPR7 DNA溶液に含まれるDNAのコピー

数が算出された。このDNAコピー数が明らかとなった増幅ヒトGPR7 DNAを標準ヒトGPR7 DNAとして、定量を目的としたTaqMan PCRに用いることにした。

ヒトGPR7 CHO細胞株の発現ヒトGPR7遺伝子コピー数は、TaqMan PCR法により決定された。TaqMan PCR反応液の組成は、蒸留水で100倍希釈した逆転写cDNA溶液 1 μ lまたは種々のコピー数の標準ヒトGPR7 DNA溶液 1 μ l、合成DNAプライマー（配列番号：147）0.2 μ M、合成DNAプライマー（配列番号：148）0.2 μ M、ヒトGPR7 TaqManプローブ（配列番号：77（Fam-TTCATCCTCA ACCTGGCCAT CGC-Tamra；配列中、Famは6-carboxy-fluoresceinを、Tamraは6-carboxy-tetramethyl-rhodamineを、それぞれ示す。）で表される塩基配列を有するプローブ）0.2 μ MおよびTaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems社)で、総反応量を25 μ lとした。PCR反応は、ABI PRISM 7700 Sequence Detector System (Applied Biosystems社)を用い、50℃・2分、95℃・10分で保温し、次に95℃・15秒、60℃・60秒のサイクルを40回繰り返すことにより行なった。ヒトGPR7遺伝子発現量はABI PRISM 7700 SDSソフトウェアによって算出した。リポーターの蛍光強度が、設定された値に達した瞬間のサイクル数を縦軸にとり、種々の標準ヒトGPR7 DNAのコピー数の対数値を横軸にとって標準曲線を作成した。標準曲線より逆転写cDNAに含まれるヒトGPR7 cDNAのコピー数を算出し、total RNA 1ng当たりのヒトGPR7遺伝子発現量を決定した。ヒトGPR7遺伝子発現量の高いクローンNo. 7, 8および 14を、ヒトGPR7遺伝子高発現細胞株として選択した。

20

参考例80 ヒトGPR7発現CHO細胞を用いた細胞内cAMP産生量の測定

参考例78で作製し、参考例79に記載したようにして選択したヒトGPR7発現CHO細胞を24穴プレートに5 x 10⁴ cell/wellで播種し、48時間培養した。細胞を0.2 mM 3-イソブチルメチルキサンチン、0.05% BSA（ウシ血清アルブミン）および20 mM HEPESを含むMEM α バッファー（pH7.4）で洗浄した（以下、0.2 mM

3-イソブチルメチルキサンチン、0.05% BSAおよび20 mM HEPESを含むMEM α バッファー（pH7.4）を、反応用バッファーと呼ぶ）。その後0.5 mlの反応用バッファーを加えて30分間培養器で保温した。反応用バッファーを除き、新たに0.25 mlの反応用バッファーを細胞に加えた後、適当な濃度のDMSO溶液とした試料と2

μ Mフォルスコリンを含む0.25 mlの反応用バッファーを細胞に加え、37℃で30分間反応させた。100 μ lの20%過塩素酸を加えて反応を停止させ、次に氷上で1時間置くことにより細胞内cAMPを抽出した。抽出液中のcAMP量は、cAMP EIAキット（アマシャムファルマシアバイオテック）を用いて測定した。

5

参考例81 ヒトGPR7発現CHO細胞を用いて測定した23残基または30残基のGPR8リガンドペプチドヒトホモログの細胞内cAMP産生抑制活性

hGPR8L(1-23)またはhGPR8L(1-30)を種々の濃度で、参考例80に記載した方法に従い、ヒトGPR7発現CHO細胞に投与して細胞内cAMP産生抑制活性を測定した。結果を図15に示す。図中、cAMP合成抑制活性は、フォルスコリンを含む反応用バッファーを添加したときの細胞内cAMP量から反応用バッファーを添加したときの細胞内cAMP量を減じた量を100%として、hGPR8L(1-23)またはhGPR8L(1-30)を加えたときの細胞内cAMP量から反応用バッファーを添加したときの細胞内cAMP量を減じた量を%として表わした。

明らかにhGPR8L(1-23)およびhGPR8L(1-30)は濃度依存的にヒトGPR7発現CHO細胞細胞内cAMPの産生を抑制した。このことからhGPR8L(1-23)およびhGPR8L(1-30)が、ヒトGPR7に対するリガンドであることが明らかとなった。cAMP産生量から50%阻害濃度(IC₅₀値)を算出したところ、hGPR8L(1-23)のIC₅₀値は0.025 nMであった。また、hGPR8L(1-30)のIC₅₀値は0.13 nMであった。

hGPR8L(1-23)のブタ、ラットおよびマウスのホモログおよびhGPR8L(1-30)のブタ、ラットおよびマウスのホモログを用いても、上記と同様にヒトGPR7発現CHO細胞の反応を確認できる。

25

参考例82 [¹²⁵I-Tyr¹⁰]-hGPR8L(1-23)を用いた受容体結合実験

参考例42に記載した方法により作製した [¹²⁵I-Tyr¹⁰]-hGPR8

L (1-23) およびヒトGPR7発現CHO細胞から調製した細胞膜画分を用いて受容体結合実験を行なった。

最初に膜画分の調製法を以下に記載する。

1 x 10⁸個のヒトGPR7発現CHO細胞に10mlのホモジネートバッファー
5 (10mM NaHCO₃, 5mM EDTA (エチレンジアミン四酢酸)、0.5mM PMSF (フェニルメタンスルホニルフルオリド)、1μg/ml
ペプスタチン、4μg/ml E64、20μg/ml ロイペプチン) 添加し、ポリトロン (12, 000 rpm, 1分間) を用いて破碎した。細胞破碎液を遠心 (1, 000 g, 15分間) して上清を得た。次にこの上清を超遠心分離
10 (Beckman type 30ローター、30, 000 rpm, 1時間) し、得られた沈殿物をヒトGPR7発現CHO細胞膜画分とした。

かくして調製された細胞膜画分を、アッセイ用バッファー (25mM Tris-HCl, 5mM EDTA, 0.05% CHAPS (3-[(3-コラミドプロピル) ジメチルアンモニオ] -1-プロパン硫酸)、0.1% BSA,
15 0.5mM PMSF, 1μg/ml ペプスタチン、20μg/ml ロイペプチン、4μg/ml E-64, pH7.4) で各種濃度に希釈後、ポリプロピレン製試験管 (Falcon 2053) に200μlずつ分注した。最大結合量を測定するために2μlのDMSOと8 nMの [¹²⁵I-Tyr¹⁰] -hGPR8L (1-23) 2μlを膜画分溶液に添加した。また、非特異的結合
20 を測定するために1mM hGPR8L (1-23) のDMSO溶液2μlと8 nMの [¹²⁵I-Tyr¹⁰] -hGPR8L (1-23) 2μlを膜画分溶液に添加した。25℃で75分間反応させた後、ポリエチレンイミン処理したワットマングラスフィルター (GF-F) を用いて反応液を吸引しさらにフィルターを洗浄用バッファー (25mM Tris-HCl, 5mM EDTA,
25 0.05% CHAPS, 0.1% BSA, pH7.4) 1.5mlで2回洗浄した。ろ過後、γ-カウンターを用いてろ紙に残った放射活性を測定し、最大結合量から非特異的結合量を引いて特異的結合量を見積もった。

膜画分の濃度を変化させると膜画分の濃度に依存した [¹²⁵I-Tyr¹⁰] -hGPR8L (1-23) の特異的な結合が認められた。膜画分濃度を10μg

／mlに設定してhGPR8L(1-23)およびhGPR8L(1-30)による $[^{125}\text{I-Tyr}^{10}]$ -hGPR8L(1-23)のヒトGPR7発現細胞膜画分への特異的結合に対する結合阻害を調べた。阻害率から50%阻害濃度(IC_{50} 値)を算出したところ、hGPR8L(1-23)の IC_{50} 値は0.09
5 9 nMであった。また、hGPR8L(1-30)の IC_{50} 値は0.025 nMであった。

これより、hGPR8L(1-23)およびhGPR8L(1-30)がヒトGPR7発現細胞膜画分に対して高い親和性を有することが示された。このことは、hGPR8L(1-23)およびhGPR8L(1-30)がヒトGPR7
10 受容体の高親和性リガンドであることを意味するものである。図16に、種々の濃度におけるhGPR8L(1-23)およびhGPR8L(1-30)の結合阻害を示す。

hGPR8L(1-23)のラットおよびマウスのホモログおよびhGPR8L(1-30)のブタ、ラットおよびマウスのホモログを用いても、上記と同様
15 に $[^{125}\text{I-Tyr}^{10}]$ -hGPR8L(1-23)のヒトGPR7発現細胞膜画分への特異的結合に対する結合阻害を確認できる。

参考例 8 3

1) GPR7発現CHO細胞の膜画分を用いたGTP γ S結合活性の測定

20 GPR7発現CHO細胞膜画分に対する $[^{35}\text{S}]$ -guanosine 5'-(γ -thio)triphosphate (GTP γ S)の結合促進活性を以下の方法により測定した。

参考例82に記載の方法により調製したGPR7発現CHO細胞膜画分を膜希釈緩衝液(50mM トリス塩酸緩衝液(pH7.4)、5mM MgCl_2 、150 mM NaCl、1 μ M GDP、0.1% BSA)で希釈して、タンパク質濃度30 μ g/mlのアッセイ用細胞膜画分溶液を
25 調製した。アッセイ用膜画分溶液200 μ lに、50 nM濃度の $[^{35}\text{S}]$ -guanosine 5'-(γ -thio)triphosphate (NEN社)を2 μ lと適当な濃度のDMSO溶液とした試料2 μ lとを添加し、この混合液を25℃で1時間保温した。混合液をフィルター濾過し、さらにフィルターを洗浄用バッファー(50mM トリス塩酸緩衝液(pH7.4)、5mM MgCl_2 、1mM EDTA、0.1% BSA)1.5mlで2回洗浄した後、フィルターの放射活性を液体

シンチレーションカウンターで測定した。

2) GPR7発現CHO細胞膜画分を用いて測定したhGPR8L (1-23) またはhGPR8L (1-30) のGTP γ S結合促進活性

hGPR8L (1-23) またはhGPR8L (1-30) を種々の濃度で、上記1) に記載した方法に従い、GPR7発現CHO細胞膜画分に投与し、GTP γ S結合促進活性を測定した。

結果を図17に示す。

これより明らかに、hGPR8L (1-23) およびhGPR8L (1-30) は濃度依存的にGPR7発現CHO細胞膜画分のGTP γ S結合を促進した。

10 GTP γ S結合促進活性から50%有効濃度 (EC_{50} 値) を算出したところ、hGPR8L (1-23) の EC_{50} 値は0.74nMであった。また、hGPR8L (1-30) の EC_{50} 値は0.67nMであった (表3)。

hGPR8L (1-23) のラットおよびマウスのホモログおよびhGPR8L (1-30) のブタ、ラットおよびマウスのホモログを用いても、上記と同様にヒトGPR7発現CHO細胞の反応を確認できる。

参考例84 GPR7発現CHO細胞膜画分を用いて測定したGPR8リガンドペプチドのヒトおよびブタホモログの誘導体のGTP γ S結合促進活性

参考例で得られたGPR8リガンドペプチドのヒトおよびブタホモログの誘導体を、種々の濃度で、参考例83に記載した方法でGPR7発現CHO細胞膜画分に投与し、GTP γ S結合促進活性を測定した。

測定した誘導体およびGTP γ S結合促進活性を表3に示す。活性は、50%有効濃度 (EC_{50} 値) で示した。

表 3

GPR8リガンドペプチドのヒトおよびブタホモログの誘導体のGTP γ S結合促進活性
および受容体結合活性

誘導体	GTP γ S結合促進活性 (EC ₅₀ nM)	受容体結合活性 (IC ₅₀ nM)
hGPR8L (1-23)	0.74	0.072
hGPR8L (1-30)	0.67	0.025
[Met (0)]-hGPR8L (1-23)	1.6	0.17
Fmoc-hGPR8L (1-23)	6.6	0.14
Ac-hGPR8L (1-23)	1.5	0.077
[D-Trp ¹]-hGPR8L (1-23)	2.3	0.63
hGPR8L (2-23)	7410	140
Ac-hGPR8L (2-23)	7000	570
IndPr-hGPR8L (2-23)	0.85	0.044
hGPR8L (4-23)	>10000	1200
hGPR8L (9-23)	>10000	2200
hGPR8L (1-20)	0.88	0.094
hGPR8L (1-19)	84	1.7
hGPR8L (1-18)	6200	2400
pGPR8L (1-23)	0.35	0.066
[Met (0)]-pGPR8L (1-23)	1.2	0.22

- 5 参考例 85 GPR7発現CHO細胞膜面分および [¹²⁵I-Tyr¹⁰]-hGPR8L (1-23) を用いて測定したGPR8リガンドペプチドのヒトおよびブタホモログの誘導体の受容体結合活性

参考例で得られたGPR8リガンドペプチドのヒトおよびブタホモログの誘導体の受容体結合活性を、参考例 82 に記載した方法でGPR7発現CHO細胞膜面分

- 10 および [¹²⁵I-Tyr¹⁰]-hGPR8L (1-23) を用いて測定した。

測定した誘導体のおよび受容体結合活性を表 3 に示す。受容体結合活性は 50 % 結合阻害濃度 (IC₅₀ 値) で示した。

実施例 1

- 15 hGPR8L (1-23) の皮下への持続投与によるラット摂餌量および体重

増加に対する作用

(1) 摂餌量および体重増加に対する作用

- Wistar雄性ラット（8週齢、日本チャールズリバー）を1週間ほどMF粉末食（オリエンタル酵母（株））で馴化した。生理食塩水に1 mM 濃度で溶解したhGPR8L (1-23)〔ヒトGPR 8リガンド (1-23)〕またはvehicle群として生理食塩水を200 μ l 充填した浸透圧ポンプ(alzet, MINI-OSMOTIC PUMP Model 2001, 放出速度; 2.4 μ l /day)をペントバルビタール麻酔下の上記ラットの皮下（背中中央）に装着した（各n=6）。装着日の翌日を0日目とし、MF粉末食を自由摂食下8日目まで毎日8時と20時に餌の量と体重を測定した。8時から20時を明期、20時から翌朝8時を暗期とした。8日目の8時に測定後断頭屠殺し、肝臓、腎臓、心臓、脾臓、精巣、腎臓周囲の脂肪、性器周囲の脂肪および褐色脂肪の重量を測定した。動物は全て明期周期12時間（明：8時から20時）で飼育した。

- 摂餌量は、明期では両群での差が見られなかったが、暗期ではhGPR8L (1-23) 投与群はvehicle群に比較していずれの測定時点においても減少傾向が見られ（図 18および19）、1日の摂餌量の総量で減少が見られた（図20）。体重（平均値±標準誤差）は、投与2日目以降から徐々に差が広がり投与7日目においてvehicle群 378.4 ± 5.8 gに対してhGPR8L (1-23) 投与群は364.6 ± 6.0 gであった（図21）。また、0日目から7日目までの体重の増加量はvehicle群 39.6 ± 4.1 gに対してhGPR8L (1-23) 投与群は28.9 ± 3.2 gであり、hGPR8L (1-23) の1週間の皮下の持続投与により体重の増加が約10.7g抑制された（図22）。

投与8日目の臓器重量を比較すると、vehicle群と比較してhGPR8L (1-23) 投与群では、肝臓（1.6 gの減少）ならびに白色脂肪組織である腎臓周囲脂肪（1.2 gの減少）および性器周囲脂肪（0.7 gの減少）においてそれぞれ0.5 g以上の減少がみられた（表4）。

表4 投与8日目の臓器重量

	Vehicle群 (g)	GPR8リガンド (1-23) 群 (g)
肝臓	15.8 ± 0.2	14.2 ± 0.7
腎臓	2.8 ± 0.09	2.6 ± 0.09
心臓	1.2 ± 0.03	1.1 ± 0.04
脾臓	1.0 ± 0.02	1.0 ± 0.06
精巣	3.7 ± 0.14	3.4 ± 0.12
腎臓周囲脂肪	5.0 ± 0.29	3.8 ± 0.53
性器周囲脂肪	6.2 ± 0.26	5.5 ± 0.38
褐色脂肪	0.32 ± 0.03	0.45 ± 0.05

(平均値 ± 標準誤差、n=6)

- 5 以上の結果からhGPR8L (1-23) の皮下投与によって摂餌量の減少および脂肪重量の低下を伴う体重増加抑制効果が認められた。

(2) 血中グルコース、総コレステロールおよびトリグリセリドに対する作用

- 上記(1)のhGPR8L (1-23) 投与群およびvehicle群の投与8日目の血中グルコース、総コレステロールおよびトリグリセリドを富士ドライケムを用いて測定した。血中グルコース濃度 (vehicle群; 150 ± 4.9 mg/dl, hGPR8L (1-23) 投与群; 155 ± 4.5 mg/dl) および血中総コレステロール濃度 (vehicle群; 73.6 ± 2.4 mg/dl, hGPR8L (1-23) 投与群; 69.1 ± 1.8 mg/dl) に両群の差は認められなかったが、血中トリグリセリド濃度 (vehicle群; 168 ± 8.9 mg/dl, hGPR8L (1-23) 投与群; 134 ± 28 mg/dl) は、hGPR8L (1-23) 投与群において30 mg/dl以上の低値を示した (図23)。

- 15 以上の結果から、hGPR8L (1-23) の皮下投与によって血中トリグリセリド濃度の低下が認められた。

実施例 2

hGPR8L (1-23) の腹腔内投与によるラットの摂餌量および体重に対する作用

- 5 実施例 1 と同様にWistar雄性ラット (8週齢、日本チャールスリバー) を 1 週間ほどMF粉末食 (オリエンタル酵母 (株)) で馴化した。生理食塩水に 0.2 mg/ml および 2 mg/ml 濃度で溶解したhGPR8L (1-23) [ヒトGPR 8リガンド (1-23)] または vehicle群として生理食塩水を 1 ml/kg の割合で暗期の開始直前 (19時 45 分から 20 時) に腹腔内投与を 3 日間行なった (各n=10)。投与翌日の朝 8 時に摂餌量および体重を測定した。動物は全て 8時から20時を明期、20時から翌朝 8 時を暗期とした明期周期 12 時間で飼育した。

摂餌量は、hGPR8L (1-23) 投与群において用量依存的に減少傾向を示し、2 mg/kg 投与群では、投与後 3 日とも vehicle群と比較して有意な ($p < 0.05$ または $p < 0.01$) 減少を示した (図 24)。

- 15 体重増加量は、2 mg/kg 投与群において 3 日とも vehicle群と比較して減少傾向を示した (平均値の差; 1 日目; 1.2 g, 2 日目; 3.1 g, 3 日目; 2.3 g) (図 25)。

以上の結果から、hGPR8L (1-23) は、腹腔内投与により暗期での摂餌量の減少および体重増加抑制効果が認められた。

20

実施例 3

[Phe²] ヒトGPR8リガンド (1-20): Trp-Phe-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu (配列番号: 149) の製造

- 25 アプライドバイオシステムズ社のペプチド自動合成機 (ABI 433モデル) を使用し、プログラムに従ってC端より逐次Fmoc法によりペプチド鎖を延長し目的の保護ペプチド樹脂の合成を行った。

出発アミノ酸樹脂担体はWang (p-benzyloxybenzyl alcohol) 樹脂 (0.25 mmol) を使用し、Fmoc-Leu、Fmoc-Gly、Fmoc-Ala、Fmoc-Arg (Pbf)、Fmoc-Val、Fmoc-

Thr (Bu^t), Fmoc-His (Trt), Fmoc-Tyr (Bu^t), Fmoc-Pro, Fmoc-Ser (Bu^t), Fmoc-Lys (Boc), Fmoc-Phe, Fmoc-Trp (Boc) のFmocアミノ酸誘導体をHBTU (2- (1H-ベンゾトリアゾール-1-イル) -1, 1, 3, 3-テトラメチルウロニウム ヘキサフルオロホスフェート) によりシークエンスにしたがって逐次縮合した。

- 5 樹脂上へのペプチドの構築が終了後、保護ペプチド樹脂を乾燥した。得られた保護ペプチドの脱保護処理とペプチドの樹脂担体からの切り離しはTFA処理によって行なった。得られた粗ペプチドは0.1% TFA水によって抽出し、凍結乾燥により粉末固体として得た。続いて、粗ペプチドを逆相高速クロマトグラフィー (島津製作所、分取装置:モデルLC8A) によりアセトニトリル-0.1% TFA水の系 (10 15-35%, 80分) を用いて分取精製を行なって目的とする精製ペプチド35 mgを得た。

精製物を0.2% 3- (2-アミノエチル) インドールを含む4N メタンスルホン酸によって110℃・22時間の条件で加水分解して得た加水分解物のアミノ酸分析値は (括弧内は理論値) 以下のとおり。

- 15 Thr (1) 0.93, Ser (1) 0.92, Gly (2) 2.03, Ala (3) 3.09, Val (2) 1.90, Leu (2) 2.02, Tyr (1) 1.02, Phe (1) 1.00, His (2) 1.91, Lys (1) 0.98, Trp (1) 0.88, Arg (2) 2.06, Pro (1) 1.02

純度はHPLCにより98.8%と算出された。また、質量分析値は2266.6 (理論値2266.6) であった。

20

実施例 4

ラクトパーオキシダーゼ法を用いた [Phe², ¹²⁵I-Tyr¹⁰] ヒトGPR 8リガンド (1-20) の作製

- 25 DMSO 10μlに溶かした、実施例3に記載した製法に準じて得られた [Phe²] ヒトGPR 8リガンド (1-20) (配列番号: 149) 10 nmolを、0.1 M塩化ニッゲル水溶液10μl、0.1 M HEPES (pH 7.6) に溶かした0.001%過酸化水素水10μl、0.1 M HEPES (pH 7.6) に溶かしたラクトパーオキシダーゼ (シグマ社) 10μg/mlを10μl、および [¹²⁵I]NaI 40 MBq (NENライフサイエンスプロダクツ社) 10μlを混合して室温で50分間反応させた後、生成した [Phe², ¹²⁵I-Tyr¹⁰] ヒトGPR 8リガンド

(1-20) を以下の条件のHPLCにより分取した。

- 用いたカラムは、ODS-80TM (4.6 mm x 15 cm) (トーソー社)、溶出液Aとして10%アセトニトリル/0.1% TFA、溶出液Bとして60%アセトニトリル/0.1% TFAを用い、0-0 (2 min)、0-27 (5 min)、27-32 (40 min) %B/A+Bのグラディエント溶出法を行なった。流速は1 mL/min、カラム温度は40℃、検出は215 nmとした。このHPLC条件では、[Phe², ¹²⁵I-Tyr¹⁰] ヒトGPR8リガンド(1-20)は25分付近に溶出した。

実施例5

- 10 [Phe², ¹²⁵I-Tyr¹⁰] ヒトGPR8リガンド(1-20)を用いた受容体結合実験

- 実施例4に記載した方法によって作製した[Phe², ¹²⁵I-Tyr¹⁰] ヒトGPR8リガンド(1-20)、参考例82に記載した方法により調製されたGPR7発現CHO細胞膜画分および参考例6に記載した方法により調製されたGPR8発現CHO細胞膜画分を用いて受容体結合実験を行なった。

- 15 GPR7発現CHO細胞およびGPR8発現CHO細胞から調製した細胞膜画分をアッセイ用バッファー (25 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 0.05% CHAPS, 0.1% BSA、0.5 mM PMSF、1 μg/ml ペプスタチン、4 μg/ml E-64、20 μg/ml ロイペプチン、pH 7.4) で各種濃度に希釈後、ポリプロピレン製試験管 (Falcon 2053) に200 μlずつ分注した。最大結合量を測定するために、2 μlのDMSOおよび7 nMの[Phe², ¹²⁵I-Tyr¹⁰] ヒトGPR8リガンド(1-20) 2 μlを膜画分溶液に添加した。また、非特異的結合を測定するために100 μM ヒトGPR8リガンド(1-23)のDMSO溶液2 μlおよび7 nMの[Phe², ¹²⁵I-Tyr¹⁰] ヒトGPR8リガンド(1-20) 2 μlを膜画分溶液に添加した。25℃で75分間反応させた後、ポリエチレンイミン処理したワットマンガラスフィルター (GF-F) を用いて反応液を吸引ろ過した。ろ過後、γ-カウンターを用いて濾紙上に残った放射活性を測定し、最大結合量から非特異的結合量を引いて特異的結合量を見積もった。膜画分の濃度を変化させると膜画分の濃度に依存した[Phe², ¹²⁵I-Tyr¹⁰] ヒトGPR8リガンド(1-20)の特異的な結合が認められた。

被験試料のGPR7受容体またはGPR8受容体に対する結合阻害活性（阻害率（%））は、最大結合量（TB）から被験試料および[Phe², ¹²⁵I-Tyr¹⁰] ヒトGPR8リガンド(1-20)を加えたときに濾紙上に残った放射活性(X)を減じた値の特異的結合量(SB)に対する比率((TB-X)/SB x 100 (%))で示される。

- 5 GPR7発現CHO細胞から調製した膜画分について膜画分濃度を15 μg/mlに設定して阻害率からヒトGPR8リガンド(1-23)およびヒトGPR8リガンド(1-30)の50%阻害濃度(IC₅₀値)を算出したところ、IC₅₀値はそれぞれ0.13 nMおよび0.039 nMであった。図26に種々の濃度におけるヒトGPR8リガンド(1-23)およびヒトGPR8リガンド(1-30)の結合阻害活性を示す。GPR8発現CHO細胞から調製した膜画分について膜画分濃度を5 μg/mlに設定して阻害率からヒトGPR8リガンド(1-23)およびヒトGPR8リガンド(1-30)の50%阻害濃度(IC₅₀値)を算出したところ、IC₅₀値はそれぞれ0.19 nMおよび0.037 nMであった。図27に種々の濃度におけるヒトGPR8リガンド(1-23)およびヒトGPR8リガンド(1-30)の結合阻害活性を示す。
- 10

15

実施例6

[Phe², ¹²⁵I-Tyr¹⁰] ヒトGPR8リガンド(1-20)およびヒトGPR7発現CHO細胞膜画分を用いたGPR7とGPR8リガンドの結合性を変化させる化合物のスクリーニング方法

- 20 実施例4に記載した方法によって作製した[Phe², ¹²⁵I-Tyr¹⁰] ヒトGPR8リガンド(1-20)および参考例82に記載した方法により調製されたGPR7発現CHO細胞膜画分を用いた受容体結合実験によってGPR7とGPR8リガンドの結合性を変化させる化合物のスクリーニングを実施した。

- 25 GPR7発現CHO細胞から調製した細胞膜画分を用いた上記の実施例5において、2 μlの試験化合物のDMSO溶液および7 nMの[Phe², ¹²⁵I-Tyr¹⁰] ヒトGPR8リガンド(1-20) 2 μlを膜画分溶液に添加した。25℃で75分間反応させた後、ポリエチレンイミン処理したワットマングラスフィルター(GF-F)を用いて反応液を吸引ろ過した。ろ過後、γ-カウンターを用いて濾紙上に残った放射活性を測定し、試験化合物添加時の結合量を求めた。最大結合量からこの試験化合物添加時の結合

量を減じた値を特異的結合量によって除した百分率を求め、試験化合物の結合阻害活性(%)を算出した。

結合阻害活性を示した試験化合物について、種々の濃度に調製した試験化合物を用いて結合阻害活性を測定し、50%阻害濃度(IC_{50} 値)を求めた。より低い IC_{50} 値を与える化合物をGPR7とGPR8リガンドとの結合をより強く阻害する化合物として選択した。

一方、結合阻害活性の値として負の値が得られる化合物をGPR7とGPR8リガンドとの結合を促進する化合物として選択した。

10 産業上の利用可能性

本発明のDNAまたは本発明のポリペプチドは、例えば体重増加抑制剤、体重減少剤、脂肪量増加抑制剤、摂食抑制剤または体重増加薬などのスクリーニングに、あるいは、体重増加抑制剤、体重減少剤、脂肪量増加抑制剤、摂食抑制剤、体重増加剤として有用である。本発明のポリペプチドを用いるスクリーニング、好ましくは本発明の受容体も用いるスクリーニングで得られる体重増加抑制剤、体重減少剤、脂肪量増加抑制剤、摂食抑制剤は、安全で優れた医薬として用いられる。

請求の範囲

1. 配列番号：16で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる体重増加抑制剤。
- 5 2. 配列番号：16で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる体重減少剤。
3. 配列番号：16で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる脂肪量増加抑制剤。
- 10 4. 配列番号：16で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる摂食抑制剤。
- 15 5. 配列番号：16で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする体重増加抑制剤、体重減少剤、脂肪量増加抑制剤または摂食抑制剤のスクリーニング方法。
6. さらに、配列番号：4、配列番号：126、配列番号：138または配列番号：144で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いる請求項
- 20 5記載のスクリーニング方法。
7. 配列番号：16で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有することを特徴とする体重増加抑制剤、体重減少剤、脂肪量増加抑制剤または摂食抑制剤のスクリーニング用キット。
- 25 8. さらに、配列番号：4、配列番号：126、配列番号：138または配列番号：144で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有する請求

項7記載のスクリーニング用キット。

9. 請求項5記載のスクリーニング方法または請求項7記載のスクリーニング用キットを用いて得られる体重増加抑制剤、体重減少剤、脂肪量増加抑制剤または摂食抑制剤。

- 5 10. 配列番号：16で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を有する化合物またはその塩を含有してなる体重増加抑制剤、体重減少剤、脂肪量増加抑制剤または摂食抑制剤。

- 10 11. 配列番号：4、配列番号：126、配列番号：138または配列番号：144で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩のアゴニストを含有してなる体重増加抑制剤、体重減少剤、脂肪量増加抑制剤または摂食抑制剤。

- 15 12. 配列番号：16で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩をコードする塩基配列を含有するポリヌクレオチドを含有してなる体重増加抑制剤、体重減少剤、脂肪量増加抑制剤または摂食抑制剤。

- 20 13. 配列番号：16で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩をコードする塩基配列を含有するポリヌクレオチドを用いることを特徴とする体重増加抑制剤、体重減少剤、脂肪量増加抑制剤または摂食抑制剤のスクリーニング方法。

- 25 14. 配列番号：16で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩をコードする塩基配列を含有するポリヌクレオチドを含有することを特徴とする体重増加抑制剤、体重減少剤、脂肪量増加抑制剤または摂食抑制剤のスクリーニング用キット。

15. 請求項13記載のスクリーニング方法または請求項14記載のスクリーニング用キットを用いて得られる体重増加抑制剤、体重減少剤、脂肪量増加抑制剤または摂食抑制剤。

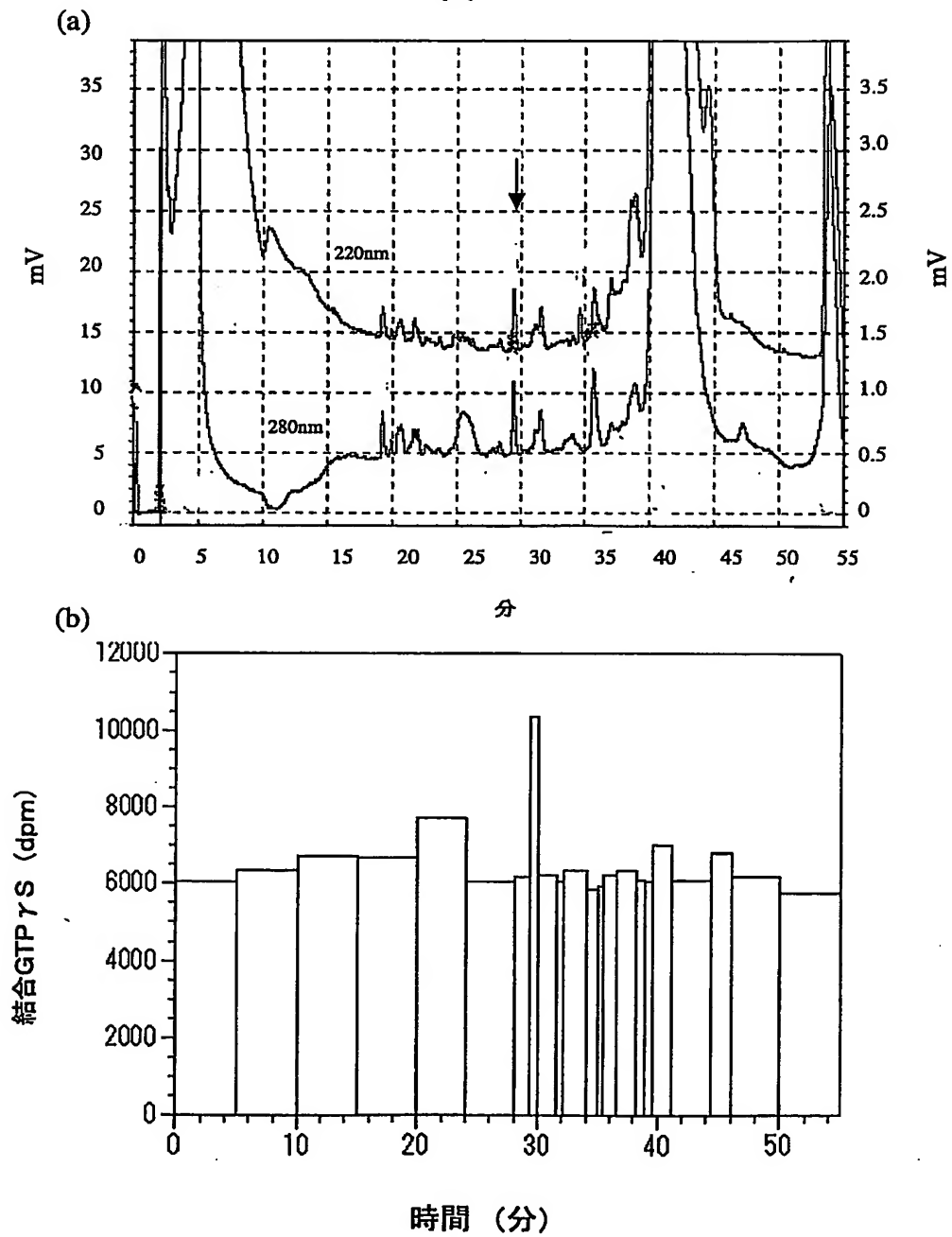
16. 配列番号：149で表されるアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチド。
17. 標識された請求項16記載のポリペプチド。
18. 請求項16記載のポリペプチドを用いる請求項5記載のスクリーニング方法。
19. (i) 請求項17記載のポリペプチド、および(ii) 配列番号：4、配列番号：126、配列番号：138または配列番号：144で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いる請求項6記載のスクリーニング方法。
20. (i) 請求項17記載のポリペプチド、および(ii) 配列番号：4または配列番号：144で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いる請求項19記載のスクリーニング方法。
21. 請求項17記載のポリペプチドおよび配列番号：144で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いる請求項20記載のスクリーニング方法。
22. 哺乳動物に対して、(1) 配列番号：16で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、(2) 上記ポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を有する化合物またはその塩、または(3) 配列番号：4、配列番号：126、配列番号：138または配列番号：144で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩のアゴニストの有効量を投与することを特徴とする体重増加抑制方法、体重減少方法、脂肪量増加抑制方法または摂食抑制方法。
23. 体重増加抑制剤、体重減少剤、脂肪量増加抑制剤または摂食抑制剤を製造するための(1) 配列番号：16で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、(2) 上記ポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそ

171

のエステルまたはその塩の活性を有する化合物またはその塩、または(3)配列番号: 4、配列番号: 126、配列番号: 138または配列番号: 144で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩のアゴニストの使用。

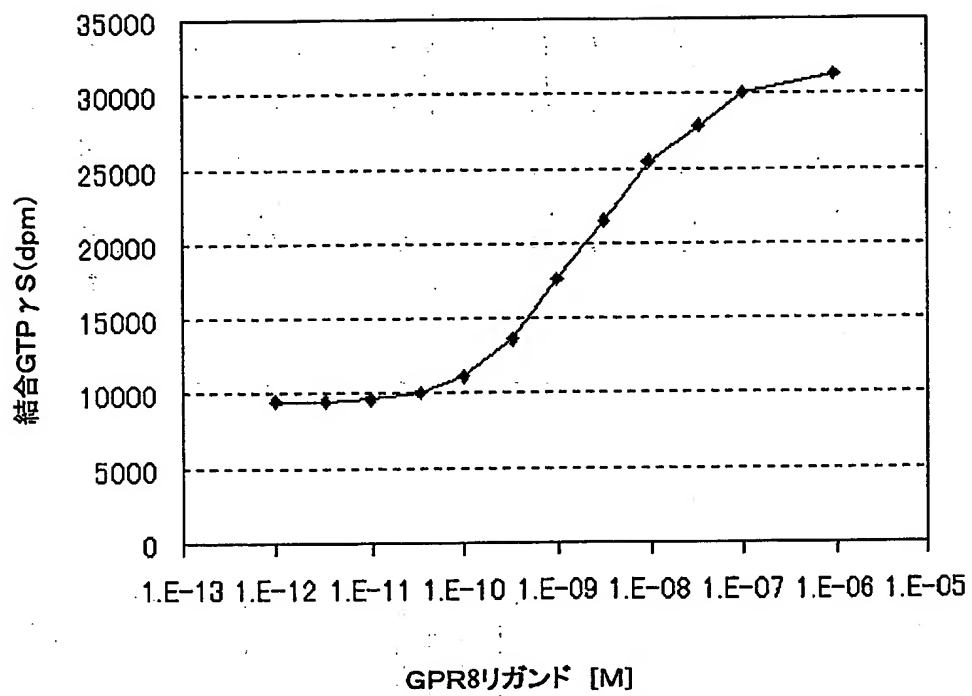
1/27

図 1



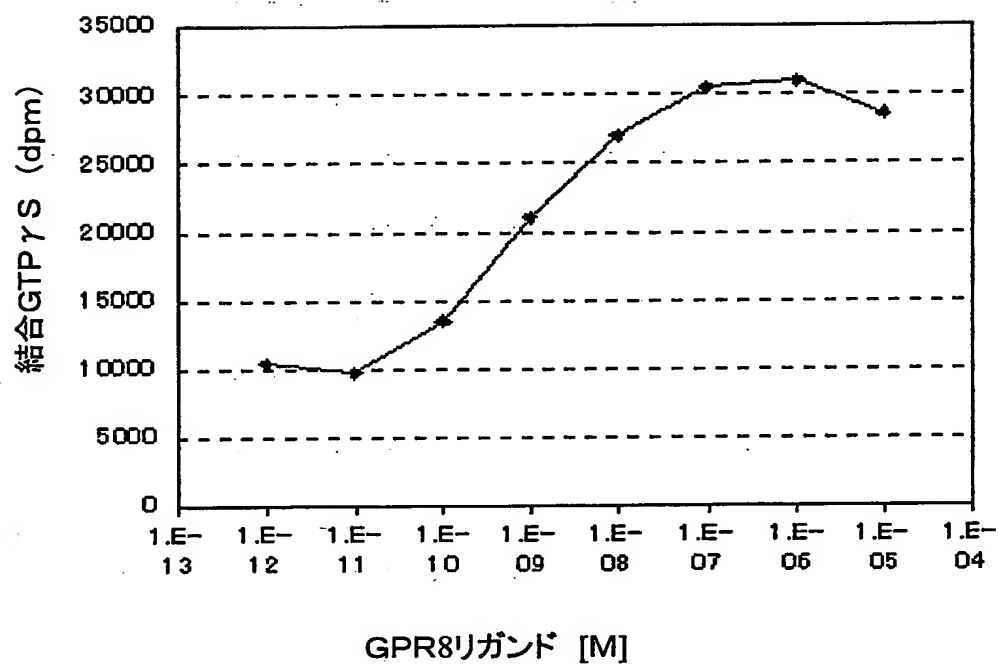
2/27

図 2



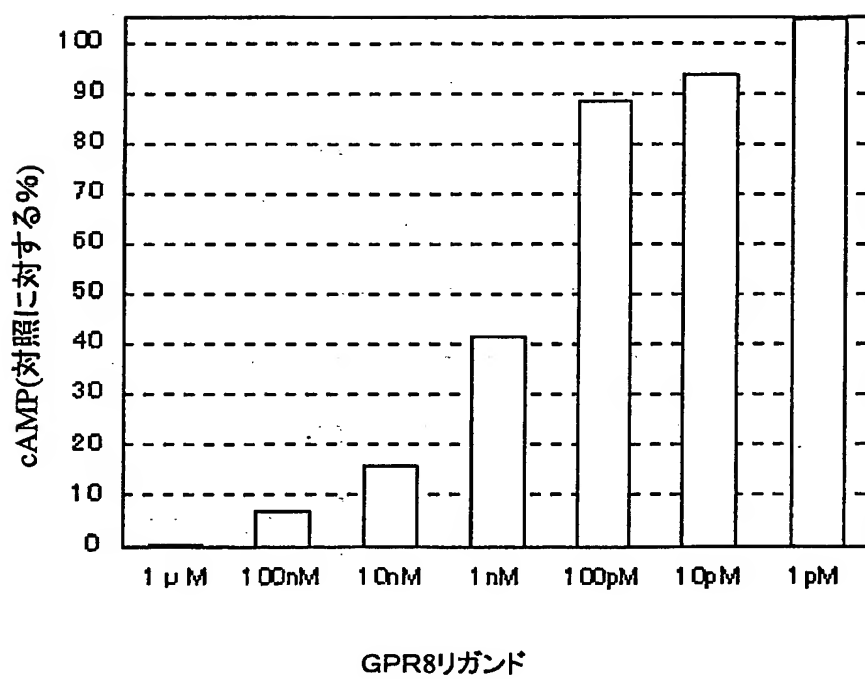
3/27

図 3



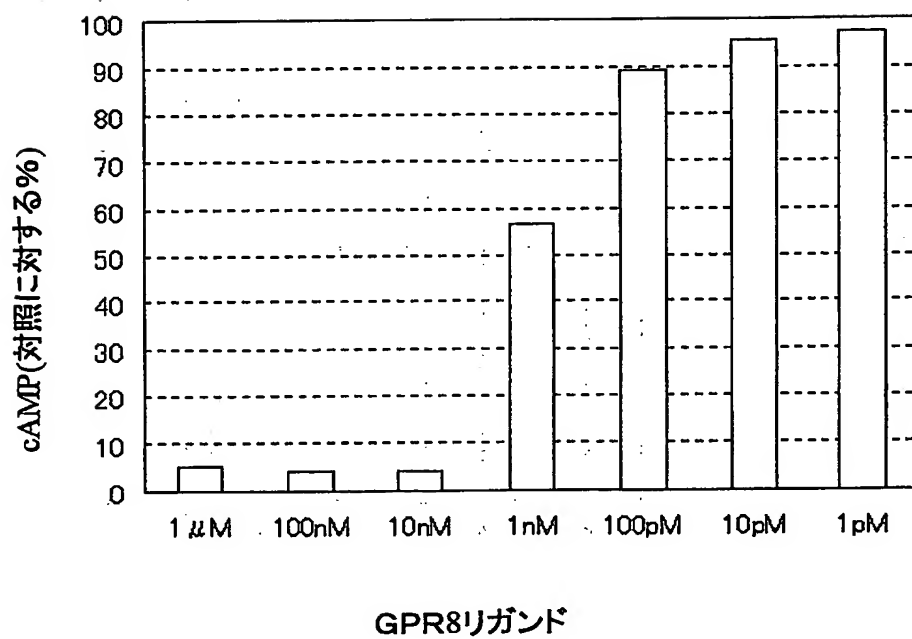
4/27

図 4



5/27

図 5



6/27

☒ 6

GGC GGG GCC ACC GAG CGG TTA TAG CTG GGC CTG CAG GGG ACC	42
CAC GGC TCG CCT CCA GCC TCC TGC GCT CCG GTA CCT GGG CGT CCC AAC TCC ACT GCG CGC	102
CCA AAC CCA GCC GAG CCG GTT CGT GGC CCG CCC CGC CGG GCG GCC GTC GAC GCG AGC GCC	162
CTG GCG TGG CGC CCA GGG GAG CGG GGG GCT CCC GCG AGC CGG CCG CGG CTG GCA CTG CTG	222
Leu Ala Trp Arg Pro Gly Glu Arg Gly Ala Pro Ala Ser Arg Pro Arg Leu Ala Leu Leu	20
CTG CTT CTG CTC CTG CTG CCG CTG CCC TCC GGC GCG	282
Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Pro Ser Gly Ala	40
TGG TAC AAG CAC GTG GCG AGT CCC	
Trp Tyr Lys His Val Ala Ser Pro	
CGC TAC CAC ACG GTG GGC CGC GCC GCT GGC CTG CTC ATG GGG CTG	342
CGT CGC TCA CCC TAT	60
Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala Ala Gly Leu Leu Met Gly Leu	
Arg Arg Ser Pro Tyr	
CTG TGG CGC CGC GCG CTG CGC GCG GCC GCC GGG CCC CTG GCC AGG GAC ACC CTC TCC CCC	402
Leu Trp Arg Arg Ala Leu Arg Ala Ala Ala Gly Pro Leu Ala Arg Asp Thr Leu Ser Pro	80
GAA CCC GCA GCC CGC GAG GCT CCT CTC CTG CTG CCC TCG TGG GTT CAG GAG CTG TGG GAG	462
Glu Pro Ala Ala Arg Glu Ala Prp Leu Leu Leu Pro Ser Trp Val Gln Glu Leu Trp Glu	100
ACG CGA CGC AGG AGC TCC CAG GCA GGG ATC CCC GTC CGT GCG CCC CGG AGC CCG CGC GCC	522
Thr Arg Arg Arg Ser Ser Gln Ala Gly Ile Pro Val Arg Ala Pro Arg Ser Pro Arg Ala	120
CCA GAG CCT GCG CTG GAA CCG GAG TCC CTG GAC TTC AGC GGA GCT GGC CAG AGA CTT CGG	582
Pro Glu Pro Ala Leu Glu Pro Glu Ser Leu Asp Phe Ser Gly Ala Gly Gln Arg Leu Arg	140
AGA GAC GTC TCC CGC CCA GCG GTG GAC CCC GCA GCA AAC CGC CTT GGC CTG CCC TGC CTG	642
Arg Asp Val Ser Arg Pro Ala Val Asp Pro Ala Ala Asn Arg Leu Gly Leu Pro Cys Leu	160
GCC CCC GGA CCG TTC TGA CAG CGT CCC CCG CCC GCC CGT GGC GCC TCC GCG CCT GAC CCA	702
Ala Pro Gly Pro Phe ***	165
GGA GGA GTG GCC GCG CG	719

7/27

☒ 7

CC TCC GGA GCC AGT TCC TGG TCC GCC CCG CCG GGA GCC GTC AGC 44

ATG AAC CCC CGG GCA CGC GGC ATG GGA GCG CCG GGC CCG GGA CCG GGG GCC ACT GCG AGG 104
Met Asn Pro Arg Ala Arg Gly Met Gly Ala Arg Gly Pro Gly Pro Gly Ala Thr Ala Arg 20

CGC CGG CTG CTG GCA TTG CTG TTA CTG CTG CTG CTG CTG CCG CTG CCC GCC CGT GCC TGG 164
Arg Arg Leu Leu Ala Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Pro Ala Arg Ala Trp 40

TAC AAG CAC ACG GCG AGT CCC CGC TAC CAC ACG GTG GGC CGC GCC GCG GGC CTG CTC ATG 224
Tyr Lys His Thr Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala Ala Gly Leu Leu Met 60

GGG CTG CGC CGC TCG CCC TAC ATG TGG CGC CGC GCG CTG CGC CCG GCG GCC GGG CCC CTG 284
Gly Leu Arg Arg Ser Pro Tyr Met Trp Arg Arg Ala Leu Arg Pro Ala Ala Gly Pro Leu 80

GCC TGG GAC ACT TTC GGC CAG GAC GTG CCC CCT CGG GGA CCC TCC GCC AGG AAC GCC CTC 344
Ala Trp Asp Thr Phe Gly Gln Asp Val Pro Pro Arg Gly Pro Ser Ala Arg Asn Ala Leu 100

TCT CCG GGG CCC GCC CCT CGC GAC GCT CCG CTG CTT CCC CCC GGG GTT CAG ACA CTG TGG 404
Ser Pro Gly Pro Ala Pro Arg Asp Ala Pro Leu Leu Pro Pro Gly Val Gln Thr Leu Trp 120

CAG GTG CGA CGC GGA AGC TTC CGC TCC GGG ATC CCG GTC AGT GCG CCC CGC AGC CCG CGC 464
Gln Val Arg Arg Gly Ser Phe Arg Ser Gly Ile Pro Val Ser Aal Pro Arg Ser Pro Arg 140

GCC CGG GGG TCC GAG CCG CAA CCG GAA TTG GGC GCC TCT TCC TGG ACC TCG GCG GAG TAG 524
Ala Arg Gly Ser Glu Pro Gln Pro Glu Leu Gly Ala Ser Ser Trp Thr Ser Ala Glu *** 159

ACC AGA GCC TTC GGA GAG TCT TCA GCT CAG CCG TGG TCT GC 565

8/27

☒ 8

	TGT AGT CGC ACC AAC TGA CTA GTC TCT TCC ATC CTC	36
CGG AGC TCC GAC GTT CTC GGG GAC ATA AAC CCT GTT CTT GTC CTA ACC CGC CAA GGG GCC		96
ATG GAC TTG AGC GCG CTG GCG TCG AGC AGA GAA GTA CGG GGC CCT GGG CCC GGG GCT CCG		156
Met Asp Leu Ser Ala Leu Ala Ser Ser Arg Glu Val Arg Gly Pro Gly Pro Gly Ala Pro		20
GTG AAC CGG CCC CTG CTA CCG CTA CTG CTG CTT CTG CTC TTG CTA CCT CTG CCC GCC AGC		216
Val Asn Arg Pro Leu Leu Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Pro Ala Ser		40
GCC TGG TAC AAG CAC GTG GCG AGC CCT CGC TAT CAC ACA GTG GGT CGT GCC TCC GGG CTG		276
Ala Trp Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala Ser Gly Leu		60
CTC ATG GGG CTG CGC CGC TCG CCC TAC CTG TGG CGC CGT GCC TTG GGT GGG GCC GCT GGA		336
Leu Met Gly Leu Arg Arg Ser Pro Tyr Leu Trp Arg Arg Ala Leu Gly Gly Ala Ala Gly		80
CCG CTC GTG GGG CTC CCG GGA CAG ATG GCC CGC AGC GCT CTC CTG CTT CCT TCC CCC GGG		396
Pro Leu Val Gly Leu Pro Gly Gln Met Ala Arg Ser Ala Leu Leu Leu Pro Ser Pro Gly		100
CAG GAG CTG TGG GAG GTA CGA AGC AGG AGT TCA CCG GCA GGA CTT CCC GTG CAT GCA ACC		456
Gln Glu Leu Trp Glu Val Arg Ser Arg Ser Ser Pro Ala Gly Leu Pro Val His Ala Thr		120
CGG AGT CTG CGG GAC CTG GAG GGA GCC GGC CAA CCT GAG CAG TCG CTA AGC TTT CAG TCC		516
Arg Ser Leu Arg Asp Leu Glu Gly Ala Gln Gln Pro Glu Gln Ser Leu Ser Phe Gln Ser		140
TGG ACT TCA GCA GAG CCC GCT GCT AGA GCC TTC GGT GAG ACG CTT CGT GCC CAG CCA TGG		576
Trp Thr Ser Ala Glu Pro Ala Ala Arg Ala Phe Gly Glu Thr Leu Arg Ala Gln Pro Trp		160
TTC CTG CAG CAA ATC ATC TTT GCC GAT CCT GTC AGG CTC GAC GAC CGT CTC AAG AAC CGA		636
Phe Leu Gln Gln Ile Ile Phe Ala Asp Pro Val Arg Leu Asp Asp Arg Leu Lys Asn Arg		180
TGG CGC CCC CGT GCT TGA CCT AAG CAG GAG CAC AGC TTG TAG CTC CAG		684
Trp Arg Pro Arg Ala ***		185

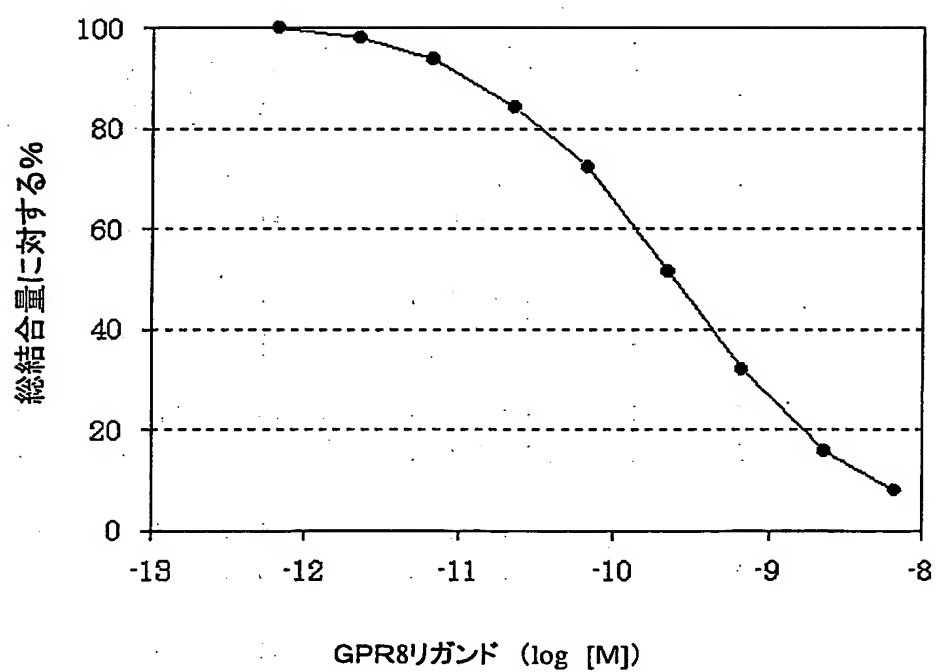
9/27

☒ 9

TGA CTG GTC TCC ATC CTC TGG AGC TCC GAC GTG CTC GTT	39
CTC GGA GAC ATA AAC CCA GTT CTT GTC CTA ACC CTC CAA GGG GCA ATT GAC GTG AGC GCG	99
CTG GCG TCT AAC AGA GAA GTA CGG GGC CCT GGG CCC GGG ACT CCC AGG AAC CGG CCC CTG	159
Leu Ala Ser Asn Arg Glu Val Arg Gly Pro Gly Pro Gly Thr Pro Arg Asn Arg Pro Leu	20
CTG CCC CTG CTG CTG CTT CTG CTC TTG CTA CCG CTG CCC GCC AGC GCC	219
Leu Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Pro Ala Ser Ala	40
TGG TAT AAG CAC	
Trp Tyr Lys His	
GTG GCG AGT CCC CGC TAT CAC ACA GTG GGT CGT GCC TCC GGG CTG CTC ATG GGG CTG	279
Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala Ser Gly Leu Leu Met Gly Leu	60
CGC TCG CCC TAC CAG TGG CGC CGT GCC CTG GGC GGG GCT GCT GGA CCC CTC TCC CGG CTC	339
Arg Ser Pro Tyr Gln Trp Arg Arg Ala Leu Gly Gly Ala Ala Gly Pro Leu Ser Arg Leu	80
CCA GGA CCG GTC GCC CGC GGC GCT CTC CTG CTT CCT TCC TCA GGG CAG GAG CTG TGG GAG	399
Pro Gly Pro Val Ala Arg Gly Ala Leu Leu Leu Pro Ser Ser Gly Gln Glu Leu Trp Glu	100
GTA CGA AGC AGG AGC TCA CCT GCA GGG CTT CCC GTC CAT GCA CCC TGG AGT CCG CGG GAC	459
Val Arg Ser Arg Ser Ser Pro Ala Gly Leu Pro Val His Ala Pro Trp Ser Pro Arg Asp	120
CTG GAG GGA GTC CGC CAA CCG GAG CAG TCG CTA AGC CTT CAC TCC TGG ATC TCA GAG GAG	519
Leu Glu Gly Val Arg Gln Pro Glu Gln Ser Leu Ser Leu His Ser Trp Ile Ser Glu Glu	140
CCC GCT GCT AGA GCC TTC GGA GAG ACG CTT CGT GCC CAG CCA TGG TTC CTG CAG CAA GTC	579
Pro Ala Ala Arg Ala Phe Gly Glu Thr Leu Arg Ala Gln Pro Trp Phe Leu Gln Gln Val	160
ATC TTT GCC GAT CCT GTC AGG CCC AAG AAC CGA TGG CGC CCC CAT GCT TGA CCT AGG CAG	639
Ile Phe Ala Asp Pro Val Arg Pro Lys Asn Arg Trp Arg Pro His Ala ***	176
GAG CAC AGC TTG AAG CTC CA	659

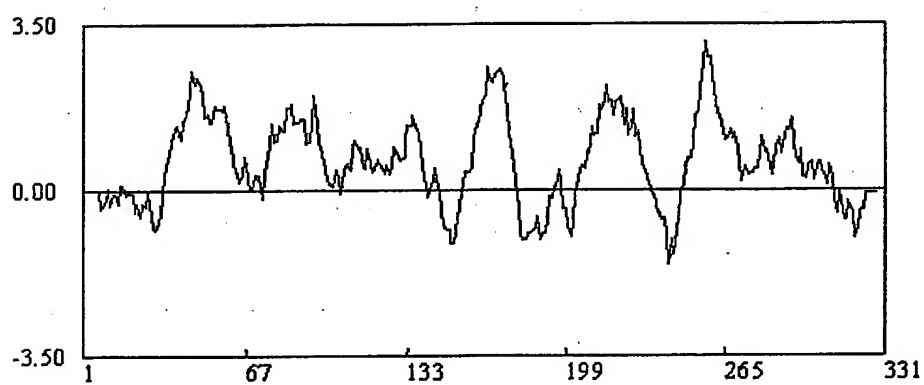
10/27

図 10



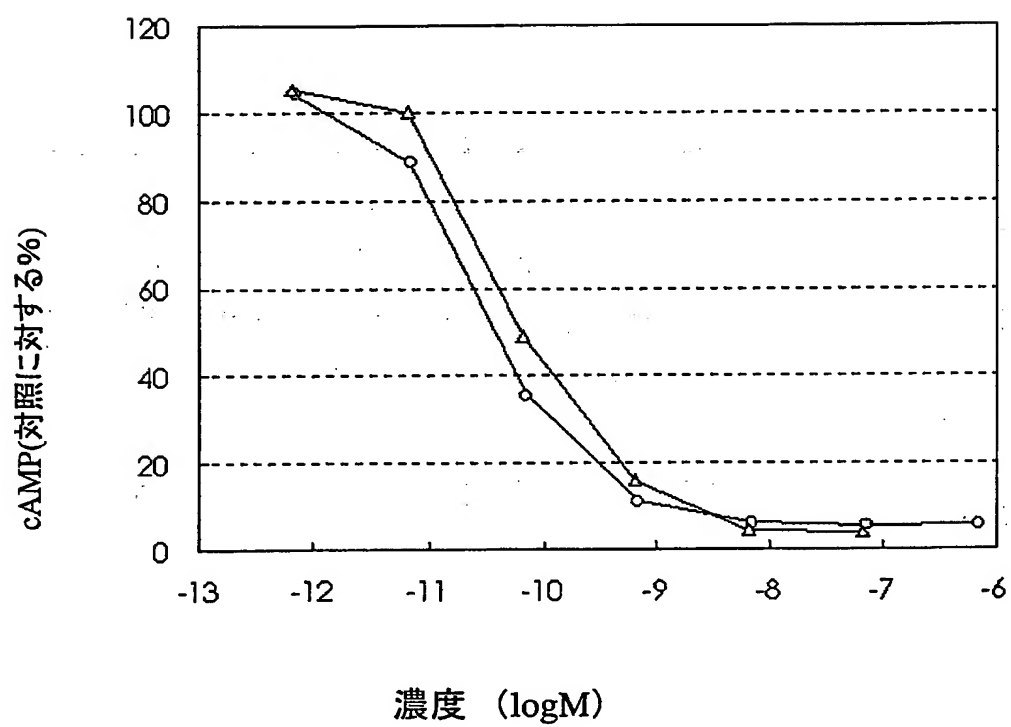
11/27

図 11



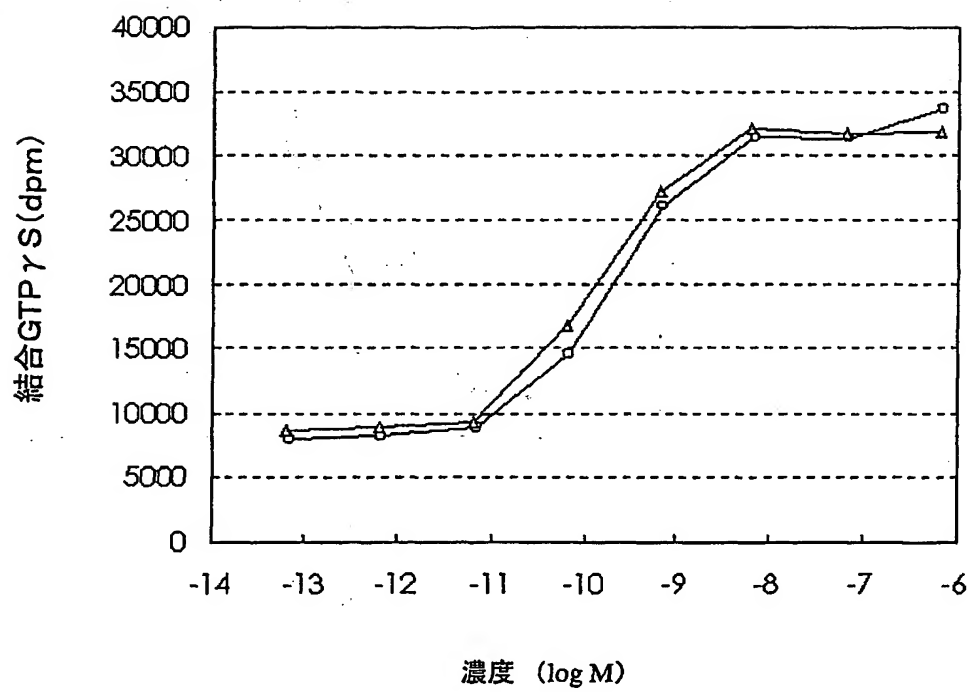
12/27

図 12



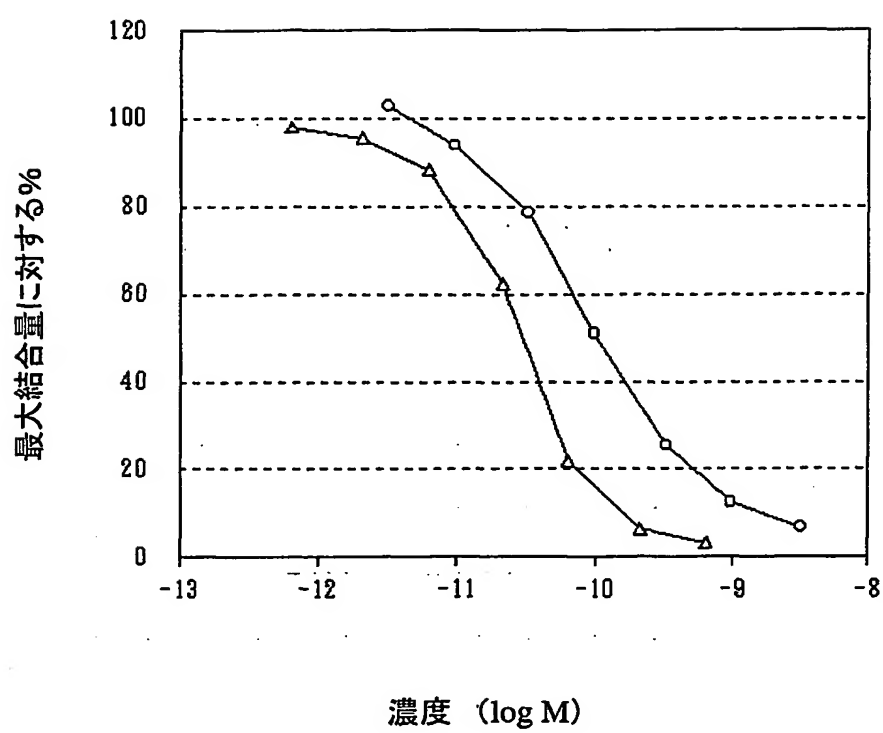
13/27

図 13



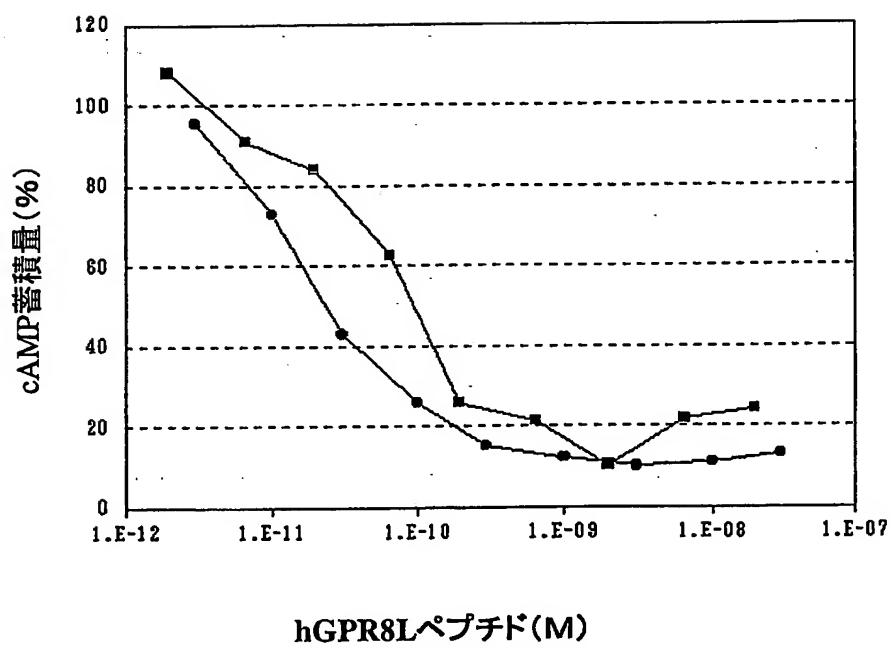
14/27

図 14



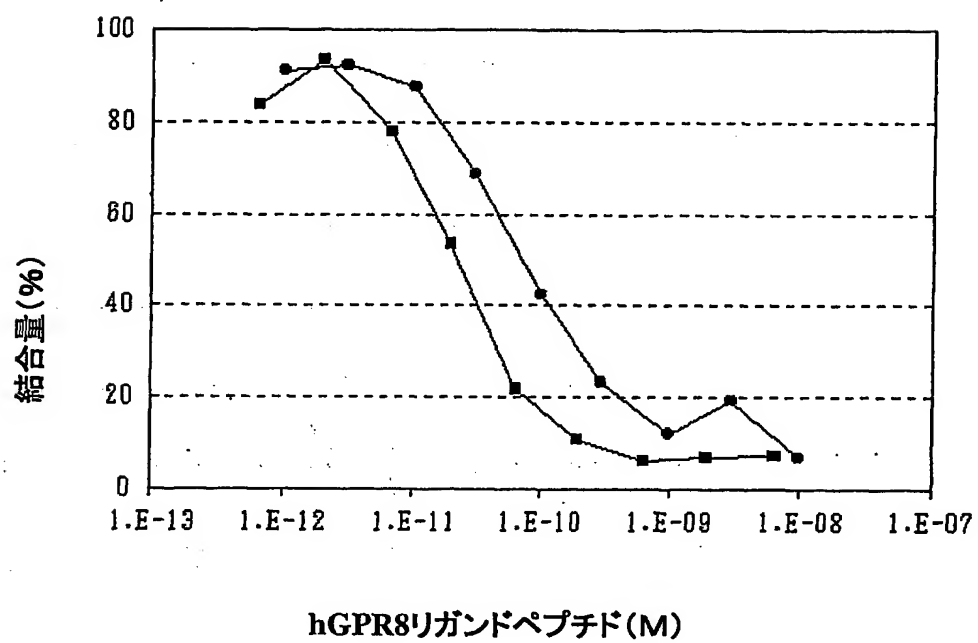
15/27

図 15



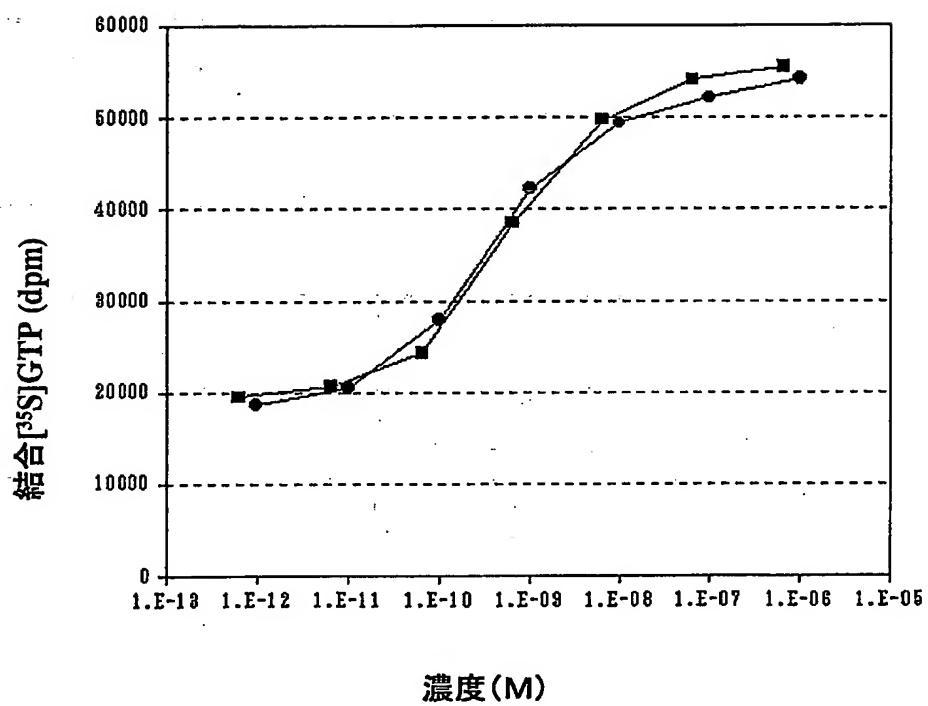
16/27

図 16



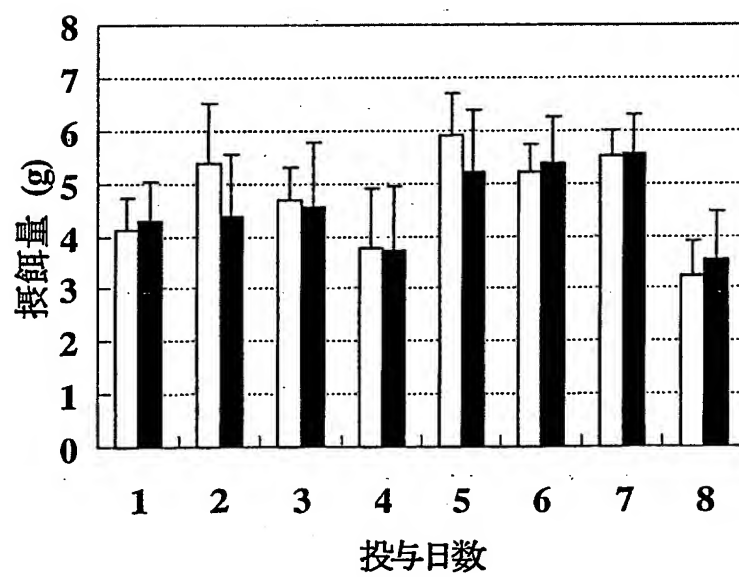
17/27

図 17



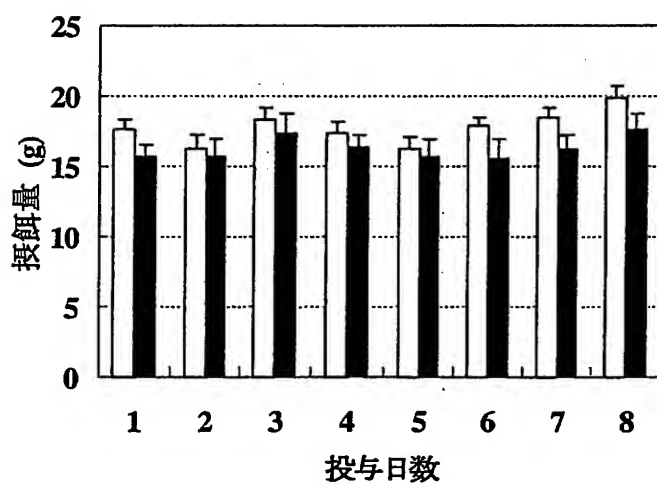
18/27

図 18



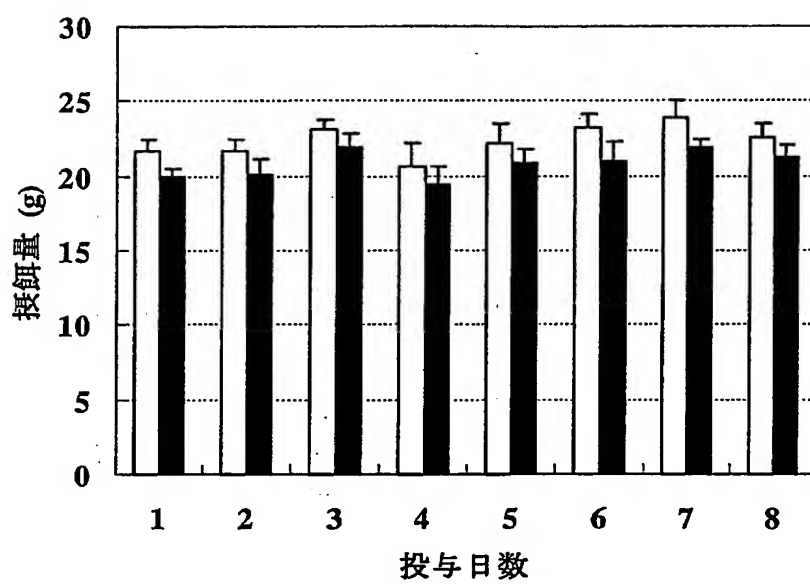
19/27

図 19



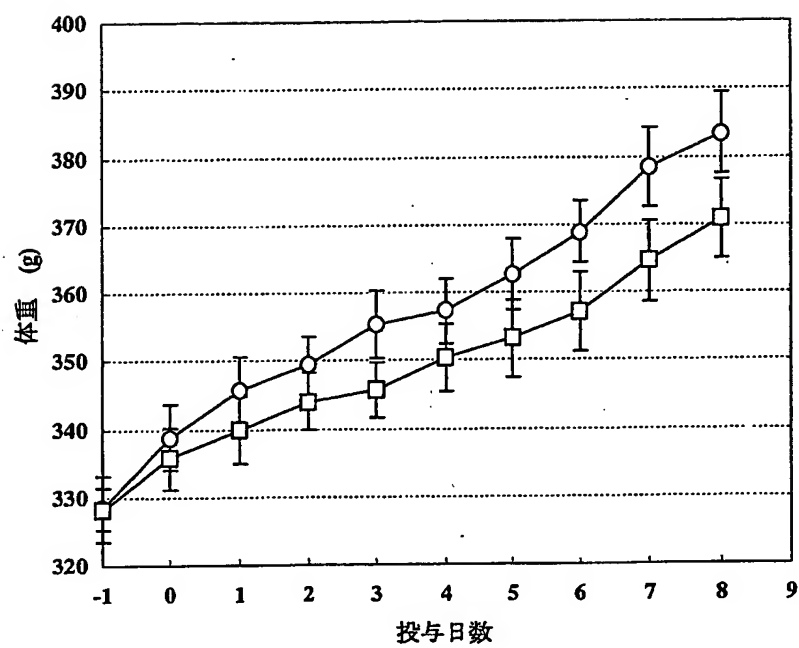
20/27

図 20



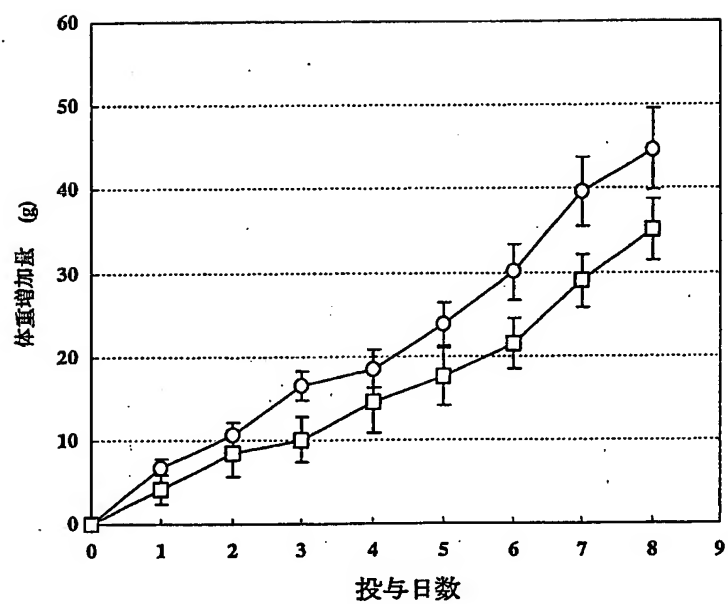
21/27

図 21



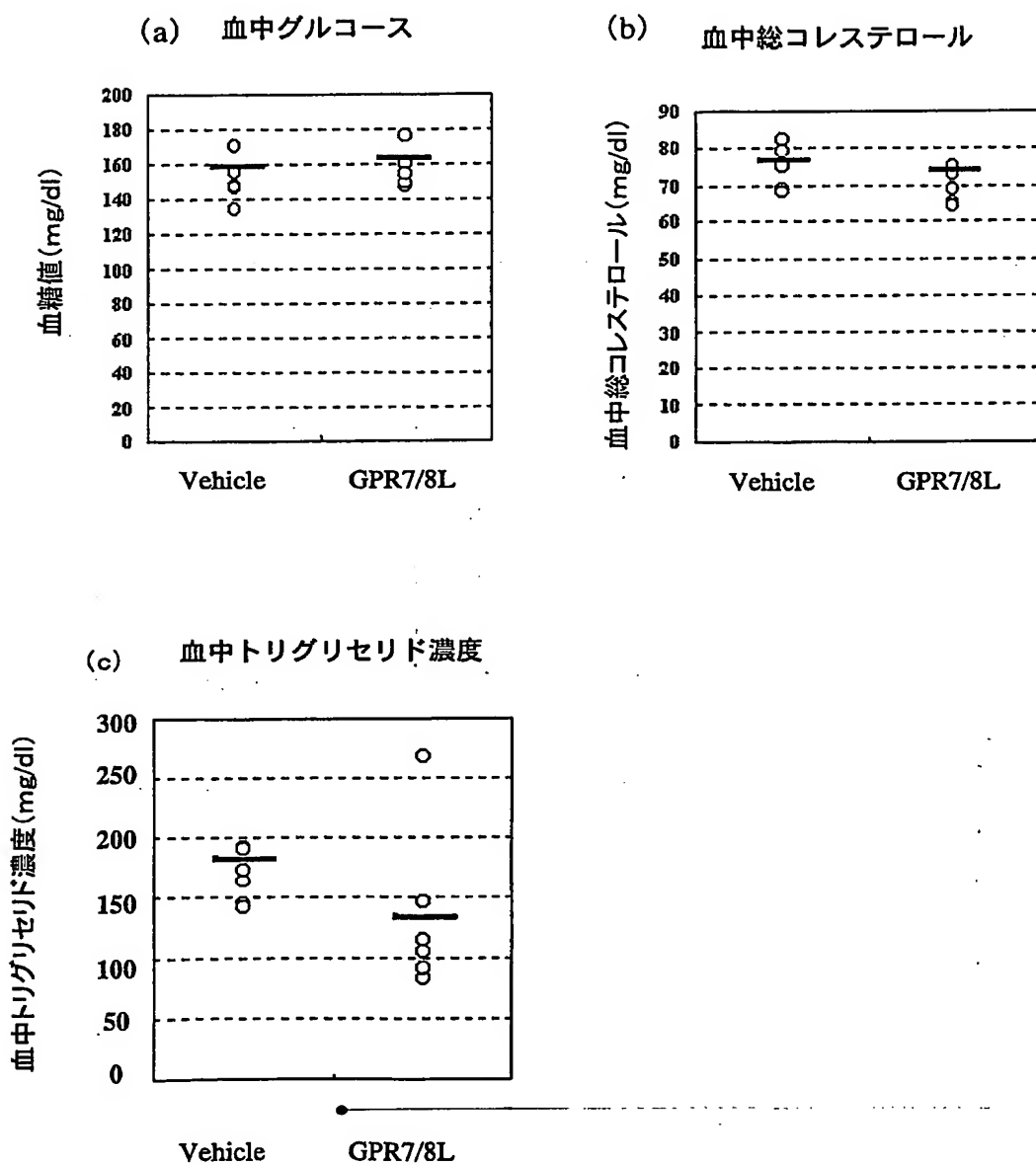
22/27

図 22



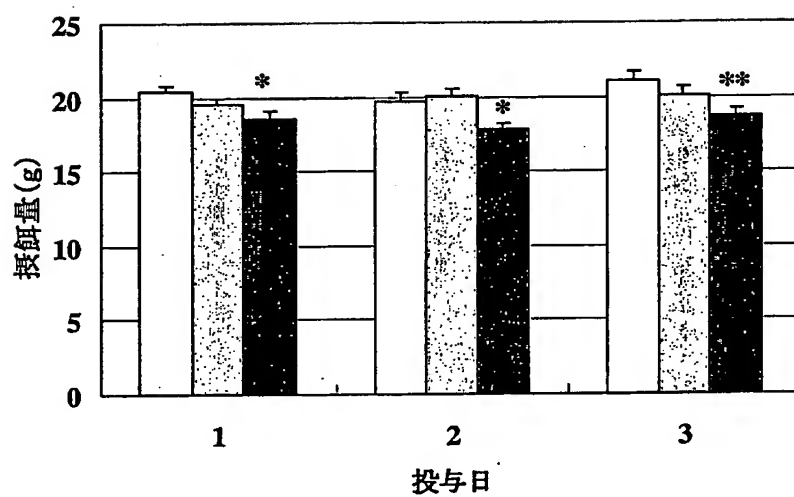
23/27

図 23



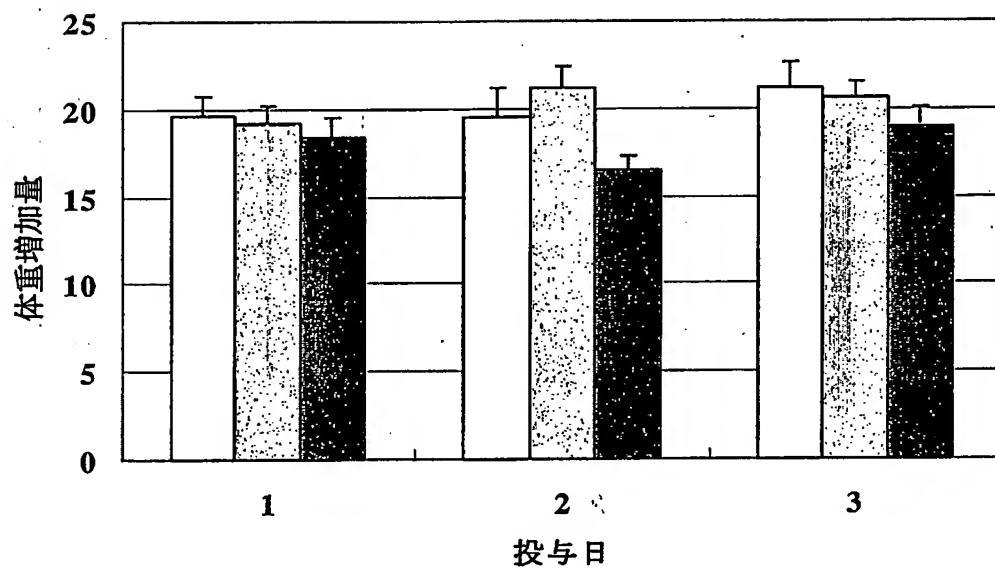
24/27

図 24



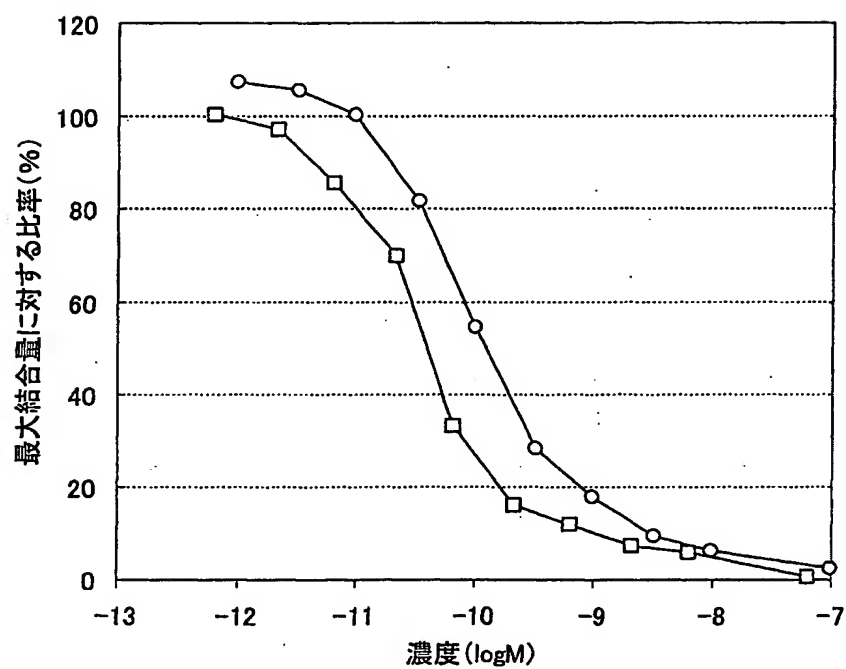
25/27

図 25



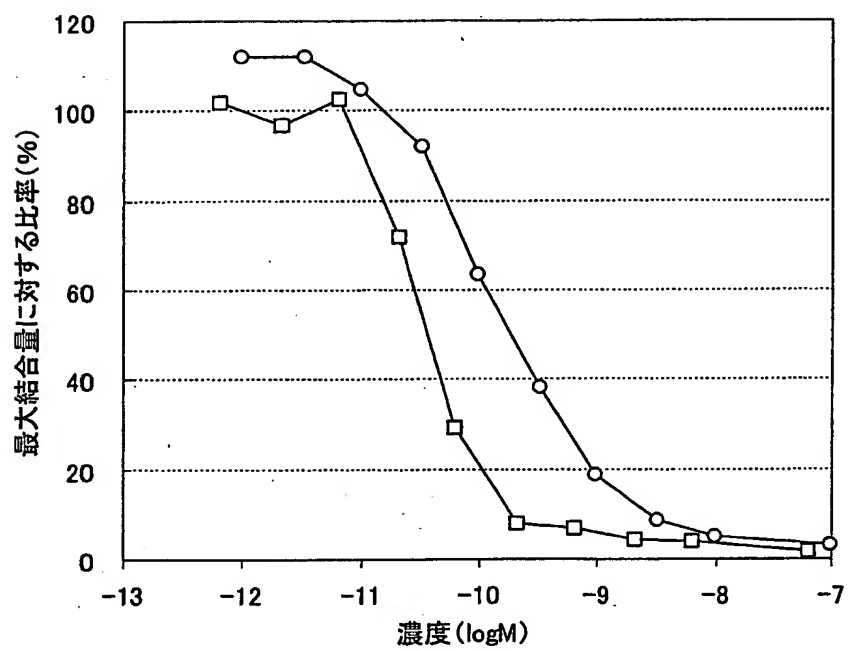
26/27

図 26



27/27

図 27



1/72

[Sequence Listing]

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Inhibitor of body weight gain

<130> P02-0149PCT

<150> JP2001-403260

<151> 2001-12-28

<150> JP2002-93096

<151> 2002-03-28

<160> 150

<210> 1

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 1

atcgattaca atgcaggccg ctgggcaccc ag 32

2/72

<210> 2

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 2

actagtgtccc ttcagcaccg caataatgctg cg 32

<210> 3

<211> 1023

<212> DNA

<213> Human

<400> 3

```
atcgattaca atgcaggccg ctgggcaccc agagccccctt gacagcaggg gctccttctc 60
cctccccacg atgggtgcc aagtctctca ggacaatggc actggccaca atgccacctt 120
ctccgagcca ctgccgttcc tctatgtgct cctgcccgcc gtgtactccg ggatctgtgc 180
tgtggggctg actggcaaca cggccgtcat ccttgtaatc ctaagggcgc ccaagatgaa 240
gacggtgacc aacglttca tctgaacct ggccgtcgcc gacgggtctc tcacgttggt 300
actgcccgtc aacatcgcg agcacctgct gcagtactgg cccttcgggg agctgctctg 360
caagctggtg ctggccgtcg accactacaa catcttctcc agcatctact tcctagccgt 420
gatgagcgtg gaccgatacc tgggtgtgct ggccaccgtg aggtcccgcc acatgccctg 480
gcgcacctac cggggggcga aggtcgccag cctgtgtgtc tggctgggcg tcacggtctc 540
ggttctgccc ttcttctctt tcgctggcgt ctacagcaac gagctgcagg tcccaagctg 600
tgggctgagc ttcccgatgc ccgagcaggt ctggttcaag gccagccgtg tctacacgtt 660
ggtcctgggc ttcgtgtctg ccgtgtgcac catctgtgtg ctctacacag acctcctgcg 720
```

3/72

caggctgcgg gccgtgcggc tccgctctgg agccaaggct ctaggcaagg ccaggcggaa 780
 ggtgaccgtc ctggtcctcg tcgtgctggc cgtgtgcctc ctctgctgga cgcccttcca 840
 cctggcctct gtcgtggccc tgaccacgga cctgccccag accccactgg tcatcagtat 900
 gtcctacgtc atcaccagcc tcagctacgc caactcgtgc ctgaaccctt tcctctacgc 960
 ctttctagat gacaacttcc ggaagaactt ccgcagcata ttgcggtgct gaagggcact 1020
 agt 1023

<210> 4

<211> 333

<212> PRT

<213> Human

<400> 4

Met Gln Ala Ala Gly His Pro Glu Pro Leu Asp Ser Arg Gly Ser Phe
 1 5 10 15
 Ser Leu Pro Thr Met Gly Ala Asn Val Ser Gln Asp Asn Gly Thr Gly
 20 25 30
 His Asn Ala Thr Phe Ser Glu Pro Leu Pro Phe Leu Tyr Val Leu Leu
 35 40 45
 Pro Ala Val Tyr Ser Gly Ile Cys Ala Val Gly Leu Thr Gly Asn Thr
 50 55 60
 Ala Val Ile Leu Val Ile Leu Arg Ala Pro Lys Met Lys Thr Val Thr
 65 70 75 80
 Asn Val Phe Ile Leu Asn Leu Ala Val Ala Asp Gly Leu Phe Thr Leu
 85 90 95
 Val Leu Pro Val Asn Ile Ala Glu His Leu Leu Gln Tyr Trp Pro Phe
 100 105 110
 Gly Glu Leu Leu Cys Lys Leu Val Leu Ala Val Asp His Tyr Asn Ile
 115 120 125

4/72

Phe Ser Ser Ile Tyr Phe Leu Ala Val Met Ser Val Asp Arg Tyr Leu
 130 135 140
 Val Val Leu Ala Thr Val Arg Ser Arg His Met Pro Trp Arg Thr Tyr
 145 150 155 160
 Arg Gly Ala Lys Val Ala Ser Leu Cys Val Trp Leu Gly Val Thr Val
 165 170 175
 Leu Val Leu Pro Phe Phe Ser Phe Ala Gly Val Tyr Ser Asn Glu Leu
 180 185 190
 Gln Val Pro Ser Cys Gly Leu Ser Phe Pro Trp Pro Glu Gln Val Trp
 195 200 205
 Phe Lys Ala Ser Arg Val Tyr Thr Leu Val Leu Gly Phe Val Leu Pro
 210 215 220
 Val Cys Thr Ile Cys Val Leu Tyr Thr Asp Leu Leu Arg Arg Leu Arg
 225 230 235 240
 Ala Val Arg Leu Arg Ser Gly Ala Lys Ala Leu Gly Lys Ala Arg Arg
 245 250 255
 Lys Val Thr Val Leu Val Leu Val Val Leu Ala Val Cys Leu Leu Cys
 260 265 270
 Trp Thr Pro Phe His Leu Ala Ser Val Val Ala Leu Thr Thr Asp Leu
 275 280 285
 Pro Gln Thr Pro Leu Val Ile Ser Met Ser Tyr Val Ile Thr Ser Leu
 290 295 300
 Ser Tyr Ala Asn Ser Cys Leu Asn Pro Phe Leu Tyr Ala Phe Leu Asp
 305 310 315 320
 Asp Asn Phe Arg Lys Asn Phe Arg Ser Ile Leu Arg Cys
 325 330

<210> 5

<211> 687

5/72

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Riboprobe

<400> 5

```

caaaagcugg agcuccaccg cgguggcggc cgcucuagcc cacuagugcc cuucagcacc 60
gcaauaugcu gcggaaguuc uuccggaagu ugucaucuag aaagcgcuag aggaaggggu 120
ucaggcacga guuggcguag cugaggcugg ugaugacgua ggacauacug augaccagug 180
gggucugggg cagguccgug gucagggcca cgacagaggc cagguggaag ggcguccagc 240
agaggaggca cacggccagc acgacgagga ccaggacggu caccuuccgc cuggccuugc 300
cuagagccuu ggcuccagag cggagccgca cggcccgcag ccugcgcagg aggucugugu 360
agagcacaca gauggugcac acgggcagca cgaagcccag gaccaacug uagacacggc 420
uggccuugaa ccagaccugc ucggggccac ggaagcucag cccacagcuu gggaccugca 480
gcucguugcu guagacgcca gcgaaagaga agaagggcag aaccaggacc gugacgccc 540
gccagacaca caggcuggcg accuucgccc cccgguaggu gcgccagggc auguggcggg 600
accucacggu gggcagcacc accagguauc gguccacgcu caucacggcu aggaaguaga 660
ugcuggagaa gauguuguag uggucga 687

```

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> Porcine

<400> 6

Trp Tyr Lys His Thr Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala

```

1           5           10           15
Ala

```


6/72

<210> 7

<211> 438

<212> DNA

<213> Human

<220>

<221>

<222> 408

<223>

<400> 7

```
gccccatgag caggccagcg gcgcggccca ccgtgtggta gcggggactc gccacgtgct 60
tgtaccacgc gccggagggc agcggcagca ggagcagaag cagcagcagt gccagccgcg 120
gccggctcgc gggagccccc cgctcccctg ggcgccacgc cagggcgctc gcgtcgacgg 180
ccgcccggcg gggcgggcca cgaaccggct cggctgggtt tgggcgcgca gtggaglttg 240
gacgcccagg taccggagcg caggaggctg gaggcgagcc gtgggtcccc tgcaggccca 300
gctataaccg ctcggtggcc ccgctcgtt ccgccccctc agtaccgctg ggctccccag 360
atggggggag ggacggaggg aggagaggga accctggcag ctggcgnggg acgtgggtac 420
ttgagcacct cactgagt 438
```

<210> 8

<211> 264

<212> DNA

<213> Human

<400> 8

```
gatagggtag gcgacgcagc cccatgagca ggccagcggc gcggcccacc gttgtgttagc 60
ggggactcgc cactgtcttg taccacgcgc cggagggcag cggcagcagg agcagaagca 120
```

7/72

gcagcagtcg cagccgcggc cggctcgcgg gagcccccg ctccccctggg cgccacgcca 180
 gggcgctcgc gtcgacggcc gcccggcggg gcggggccacg aaccggctcg gctgggtttg 240
 ggcgcgcagc ggagttggga cgcc 264

<210> 9

<211> 424

<212> DNA

<213> Human

<400> 9

galagggtga ggcacgcagc cccatgagca ggccagcggc gcggcccacc gtgtggtagc 60
 ggggactcgc cacgtgcttg taccacgcgc cggagggcag cggcagcagg agcagaagca 120
 gcagcagtcg cagccgcggc cggctcgcgg gagcccccg ctccccctggg cgccacgcca 180
 gggcgctcgc gtcgacggcc gcccggcggg gcggggccacg aaccggctcg gctgggtttg 240
 ggcgcgcagc ggagttggga cgcccaggta ccggagcgca ggaggttgga ggcgagccgt 300
 gggccccctg caggcccagc tataaccgct cggtagggccc gcctcgttcc gccccctcag 360
 taccgttggg ctccccagat ggggggaggg acggagggag gagagggaac cctggcagct 420
 ggccg 424

<210> 10

<211> 375

<212> DNA

<213> Human

<400> 10

gcgcctcacc gtgtggtagc ggggactcgc cacgtgcttg taccacgcgc cggaggcagc 60
 ggcacgagga gcagaagcag cagcagtgcc agccgcggcc ggctcgcggg agccccccgc 120
 tccccctggc gccacgcagg gctacagcgt cgacggccgc ccgcggggcc atcgcaaccg 180
 gctcggcttg gtttggcgcc gcagtgagc tgggacgccc aggtaccgga gcgcaggagg 240

8/72

ctggaggcga gccgtgggtc ccctgcaggc ccagctataa ccgctcggig gccccgcctc 300
gttccgcccc ctccagtaccg ctgggctccc cagaatgggg gagggacgga gggaggagag 360
ggaaccctgg cagct 375

<210> 11

<211> 260

<212> DNA

<213> Human

<220>

<221>

<222> 2, 61, 147, 189, 213, 237, 249

<223>

<400> 11

cnacgttctc ggggacataa accctgttct tgtcciaacc cgccaagggg ccatggactt 60
nagcgcgctg gcgtcgagca gagaagtacg gggccctggg ccggggctcc ggtgaaccgg 120
cccctgtac cgctactgct gcttctnctc ttgtacctc tgcccgccag cgcttggtac 180
aagcacgtag cgagccctcg ctatcacaca gtinggtcgt cctccgggct gctcatnggg 240
ctgcgccgnt cgtcctacct 260

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

9/72

<400> 12

aactccactg cgcgccccaaa ccca 24

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 13

tctccacag ctctgaacc cacg 24

<210> 14

<211> 375

<212> DNA

<213> Human

<400> 14

aactccactg cgcgccccaaa cccagccgag ccggttcgtg gcccgccccg ccgggcggcc 60
gtcgacgcga gcgccctggc gtggcgccca ggggagcggg gggtccccgc gagccggccg 120
cggctggcac tgctgtgtct tctgtctctg ctgccgtgc cctccggcgc gtgglacaag 180
cacgtggcga gtccccgcta ccacacggtg ggccgcgcgc ctggcctgct catggggctg 240
cgtcgtcac cctatctgtg gcgccgcgcg ctgcgcgcgg ccgccgggcc cctggccagg 300
gacacccict cccccgaacc cgcagccgcg gaggtccctc tctgtgtgcc ctctgggtt 360
caggagctgt gggag 375

<210> 15

10/72

<211> 125

<212> PRT

<213> Human

<400> 15

Asn Ser Thr Ala Arg Pro Asn Pro Ala Glu Pro Val Arg Gly Pro Pro
1 5 10 15
Arg Arg Ala Ala Val Asp Ala Ser Ala Leu Ala Trp Arg Pro Gly Glu
 20 25 30
Arg Gly Ala Pro Ala Ser Arg Pro Arg Leu Ala Leu Leu Leu Leu
 35 40 45
Leu Leu Leu Pro Leu Pro Ser Gly Ala Trp Tyr Lys His Val Ala Ser
 50 55 60
Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala Ala Gly Leu Leu Met Gly Leu
65 70 75 80
Arg Arg Ser Pro Tyr Leu Trp Arg Arg Ala Leu Arg Ala Ala Ala Gly
 85 90 95
Pro Leu Ala Arg Asp Thr Leu Ser Pro Glu Pro Ala Ala Arg Glu Ala
 100 105 110
Pro Leu Leu Leu Pro Ser Trp Val Gln Glu Leu Trp Glu
 115 120 125

<210> 16

<211> 23

<212> PRT

<213> Human

<400> 16

Trp Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala

11/72

1 5 10 15
Ala Gly Leu Leu Met Gly Leu
20

<210> 17

<211> 30

<212> PRT

<213> Human

<400> 17

Trp Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala

1 5 10 15

Ala Gly Leu Leu Met Gly Leu Arg Arg Ser Pro Tyr Leu Trp

20 25 30

<210> 18

<211> 69

<212> DNA

<213> Human

<400> 18

tggtacaagc acgtggcgag tccccgctac cacacggigg gccgcgccgc tggcctgctc 60

atggggctg 69

<210> 19

<211> 90

<212> DNA

<213> Human

12/72

<400> 19

tggtacaagc acgtggcgag tccccgtac cacacggtgg gccgcgccgc tggcctgctc 60
atggggctgc gtcgctcacc ctaictgtgg 90

<210> 20

<211> 29

<212> PRT

<213> Human

<400> 20

Trp Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala
1 5 10 15
Ala Gly Leu Leu Met Gly Leu Arg Arg Ser Pro Tyr Leu
20 25

<210> 21

<211> 28

<212> PRT

<213> Human

<400> 21

Trp Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala
1 5 10 15
Ala Gly Leu Leu Met Gly Leu Arg Arg Ser Pro Tyr
20 25

<210> 22

<211> 27

<212> PRT

13/72

<213> Human

<400> 22

Trp Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala

1 5 10 15

Ala Gly Leu Leu Met Gly Leu Arg Arg Ser Pro

20 25

<210> 23

<211> 26

<212> PRT

<213> Human

<400> 23

Trp Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala

1 5 10 15

Ala Gly Leu Leu Met Gly Leu Arg Arg Ser

20 25

<210> 24

<211> 25

<212> PRT

<213> Human

<400> 24

Trp Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala

1 5 10 15

Ala Gly Leu Leu Met Gly Leu Arg Arg

20 25

14/72

<210> 25

<211> 24

<212> PRT

<213> Human

<400> 25

Trp Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala

1

5

10

15

Ala Gly Leu Leu Met Gly Leu Arg

20

<210> 26

<211> 87

<212> DNA

<213> Human

<400> 26

tggatcaagc acgtggcgag tccccgctac cacacggtgg gccgcgccgc tggcctgctc 60

atggggctgc gtcgtcacc ctatctg 87

<210> 27

<211> 84

<212> DNA

<213> Human

<400> 27

tggatcaagc acgtggcgag tccccgctac cacacggtgg gccgcgccgc tggcctgctc 60

atggggctgc gtcgtcacc ctat 84

15/72

<210> 28

<211> 81

<212> DNA

<213> Human

<400> 28

tggtacaagc acgtggcgag tccccgtac cacacggtag gccgcgccgc tggcctgctc 60
atggggctgc gtcgtcacc c 81

<210> 29

<211> 78

<212> DNA

<213> Human

<400> 29

tggtacaagc acgtggcgag tccccgtac cacacggtag gccgcgccgc tggcctgctc 60
atggggctgc gtcgtca 78

<210> 30

<211> 75

<212> DNA

<213> Human

<400> 30

tggtacaagc acgtggcgag tccccgtac cacacggtag gccgcgccgc tggcctgctc 60
atggggctgc gtcgc 75

<210> 31

16/72

<211> 72

<212> DNA

<213> Human

<400> 31

tggtacaagc acgtggcgag tccccgtac cacacggigg gccgcgccgc tggcctgctc 60
atggggctgc gt 72

<210> 32

<211> 999

<212> DNA

<213> Human

<400> 32

atgcaggccg ctgggcaccc agagccccctt gacagcaggg gtcctttctc cctccccacg 60
atgggtgcc aactctctca ggacaatggc aciggccaca atgccacctt ctccgagcca 120
ctgccgttcc tctatgtgct cctgcccgcc gtgtactccg ggaatctgtc tgtggggctg 180
actggcaaca cggccgtcat ccttgtaatc ctaaggcgcc ccaagatgaa gacggtgacc 240
aacgtgttca tcttgaacct ggccgtcgcc gacgggctct tcacgttgtt actgccctgc 300
aacatcgccg agcacctgct gcagtactgg cccttcgggg agctgtcttg caagctggtg 360
ctggccgtcg accactaaa catcttctcc agcatctact tctagccgt gatgagcgtg 420
gaccgatacc tggtggtgct ggccaccgtg aggtcccgcc acatgccctg gcgcacctac 480
cggggggcga aggtcgccag cctgtgtgtc tggctgggcg tcacggctct ggttctgccc 540
ttcttctctt tcgtggcgct ctacagcaac gagctgcagg tccaagctg tgggtgagc 600
ttcccgtagc ccgagcgggt ctggttcaag gccagccgtg tctacacttt ggtcctgggc 660
ttcgtgtgct cgtgtgtcac catctgtgtg ctctacacag acctcctgct caggctcgcc 720
gccgtgcggc tccgtcttgg agccaaggct ctaggcaagg ccaggcgga ggtgaccgtc 780
ctggtctctg tcgtgtggc cgtgtgctc ctctgttga cgccttcca cctggcctct 840
gtcgtggccc tgaccacgga cctgccccag accccactgg tcatcagtat gtcctacgtc 900

17/72

atcaccagcc tcacgtacgc caactcgtgc ctgaaccct tctctacgc ctttctagat 960
gacaacttcc ggaagaactt ccgcagcata ttgcggtgc 999

<210> 33

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 33

tctccacag ctctgaacc cacg 24

<210> 34

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 34

acagataggg tgagcgacgc agcc 24

<210> 35

<211> 1102

<212> DNA

<213> Human

18/72

<400> 35

gccatttaag tggagtcttg aaggatgagt aggtgtagg cacagacgca cagaggcagg 60
caaagccaca ggcigtgttg ttaggcaaaa atigagactg gctggataaa gtggtcttgg 120
gggaccatca ccagagagga ggcgctggag gtctgcaagg cctgtcctg cccctccagg 180
gglagagggt ccaggagggg ctgacttttt ctcttgaag cctcacagaa ctgcagacc 240
cacggatggc ttggtgttg caacatgagg cttctaaggc ttctgcggg agatgggtt 300
gtggggagaa gctgggggtg gcagtggaac ggacagggtg tggggacagc ttggggagct 360
atgttaggca aggacaagg acaactcttg gggggactca cccagagggg tcttgaatgg 420
tgtgaaggc ccccgacagc cctcctgcaa tagccactgt agctctgcct gcacctgggc 480
cttgcctctg ctgtctccc accggcagga gtctggctaa aggggcatcc ctccagcccta 540
ctccctcatc agtgttcca gtaccactc cctggcactt ccactcctag agggaggagg 600
ctgagcaggc agagaatgg acgtgtcccc tcagaggagc ctgagccca gtccagcca 660
gcggccact cagtgggtg ctcaagtacc caggtccccc gccagctgcc agggttccct 720
ctctccctc cgtccctccc cccatctggg gagccagcg gtactgagg ggcggaacga 780
ggcggggcca ccgagcgggt atagctgggc ctgcaggga cccacggctc gcctccagcc 840
tcctgcgtc cgttacctgg gcgtcccaac tccactgcgc gcccaaacc agccgagccg 900
gttcgtggc cgtcccgccg ggcggccgtc gacgcgagc ccttggcgtg gcgcccagg 960
gagcgggggg ctcccgag ccggccggc ctggcactgc tgcgttct gctcctgtg 1020
ccgtgccct ccggcggtg gtacaagcac gtggcgagtc cccgtacca cacggtggc 1080
cgcgccgtg gcctgtcat gg 1102

<210> 36

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

19/72

<400> 36

aactccactg cgcgcccaaa ccca 24

<210> 37

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 37

ctggcactgc tgctgcttct gctc 24

<210> 38

<211> 609

<212> DNA

<213> Human

<400> 38

ctgctgccgc tggcctccgg cgcgtggtac aagcacgtgg cgagtcctcg ctaccacacg 60
gtgggccgcg ccgctggcct gctcatgggg ctgcgtcgct caccctatct gtggcgccgc 120
gcgctgcgcg cggccgccgg gcccttgcc agggacaccc tcctccccga accgcagcc 180
cgcgaggctc ctctcctgct gccctcgtgg gttcaggagc tgtgggagac gcgacgcagg 240
agctcccagg cagggatccc cgtccgtgcg ccccgagcc cgcgcgcccc agagcctgcg 300
ctggaaccgg agtccctgga ctccagcgga gctggccaga gacttcggag agacgtctcc 360
cgcccagcgg tggaccccg cagaaaccgc ctggcctgc cctgcctggc ccccgaccg 420
ttctgacagc gtcccccgcc cgcccgtggc gcctccgcgc ctgaccagg aggagtggcc 480

20/72

gcgcgcttcc aggagccgct catagacccc gcctgccgctc cggtaataa aatccgcctg 540
actcctgcgc ccccgcatgc gtaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa agcggccgct 600
gaattctag 609

<210> 39

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 39

agcggctactg agggggcgga acga 24

<210> 40

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 40

gggtctatga gcggctcctg gaag 24

<210> 41

<211> 719

<212> DNA

21/72

<213> Human

<400> 41

```

ggcggggcca cgcagcggtt atagctgggc ctgcaggga cccacggctc gcctccagcc 60
tcctgcgtc cgttacctgg gcgtcccaac tccactgcgc gcccaaacc agccgagccg 120
gttcgtggcc cgtcccgccg ggcggccgtc gacgcgagcg cccigggctg gcgccaggg 180
gagcgggggg ctcgcgcgag ccggcccgcg ctggcactgc tgcgtcttct gctcctgctg 240
ccgtgccct cggcgcgctg gtacaagcac gtggcgagtc cccgtiacca cacggtgggc 300
cgcgccgctg gcctgctcat ggggctgctg cgtcaccct atctgiggcg ccgcgcgctg 360
cgcgcggccg ccgggcccct ggccaggac accctctccc ccgaaccgc agcccgcgag 420
gtcctctcc tgcgtccctc gtgggttcag gagctgtggg agacgcgacg caggagctcc 480
caggcagga tccccgtccg tgcgccccgg agcccgcgcg cccagagcc tgcgttgaa 540
ccggagtccc tggacttcag cggagctggc cagagacttc ggagagacgt ctcgcgcca 600
gcggtggacc ccgcagaaa ccgcttggc ctgccctgcc tggcccccg accgttctga 660
cagcgtcccc cgtccgcccg tggcgctcc gcgcctgacc caggaggagt ggccgcgcg 719

```

<210> 42

<211> 165

<212> PRT

<213> Human

<400> 42

```

Leu Ala Trp Arg Pro Gly Glu Arg Gly Ala Pro Ala Ser Arg Pro Arg
1           5           10          15
Leu Ala Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Pro Ser Gly Ala
          20          25          30
Trp Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala
          35          40          45
Ala Gly Leu Leu Met Gly Leu Arg Arg Ser Pro Tyr Leu Trp Arg Arg

```


22/72

50 55 60
Ala Leu Arg Ala Ala Ala Gly Pro Leu Ala Arg Asp Thr Leu Ser Pro
65 70 75 80
Glu Pro Ala Ala Arg Glu Ala Pro Leu Leu Leu Pro Ser Trp Val Gln
85 90 95
Glu Leu Trp Glu Thr Arg Arg Arg Ser Ser Gln Ala Gly Ile Pro Val
100 105 110
Arg Ala Pro Arg Ser Pro Arg Ala Pro Glu Pro Ala Leu Glu Pro Glu
115 120 125
Ser Leu Asp Phe Ser Gly Ala Gly Gln Arg Leu Arg Arg Asp Val Ser
130 135 140
Arg Pro Ala Val Asp Pro Ala Ala Asn Arg Leu Gly Leu Pro Cys Leu
145 150 155 160
Ala Pro Gly Pro Phe
165

<210> 43

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 43

acagataggg tgagcgacgc agcc 24

<210> 44

<211> 24

23/72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 44

tgagcgacgc agcccatga gcag 24

<210> 45

<211> 235

<212> DNA

<213> Porcine

<400> 45

cgacacccct gcgccagac cctccggagc cagttcctgg tccgccccgc cgggagccgt 60
cagcatgaac ccccgggcac gcggcatggg agcgcggggc ccgggaccgg gggccactgc 120
gaggcgccgg ctgctggcat tctgtttact gctgctgctg ctgccgctgc ccgcccgtgc 180
ctggtacaag cacacggcga gtccccgcta ccacacggtg ggccgcgccc cgggc 235

<210> 46

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 46

24/72

cagcggcagc agcagcagca gtaa 24

<210> 47

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 47

cagcagtaac agcaatgccca gcag 24

<210> 48

<211> 156

<212> DNA

<213> Porcine

<400> 48

ctgtagcctc ccgcgctgcg gcttcccgac acccctgcgc ccagaccctc cggagccagt 60

tcctggtccg ccccgccggg agccgtcagc atgaaccccc gggcacgcgg catgggagcg 120

cggggcccgg gaccgggggc cactgcgagg cgccgg 156

<210> 49

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

25/72

<223> Primer

<400> 49

cggctgctgg cattgctgtt actg 24

<210> 50

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 50

cgcccgtgcc tggataaagc aca 23

<210> 51

<211> 588

<212> DNA

<213> Porcine

<400> 51

cggcgagtcc cgcctaccac acgggtggcc gcgcgcggg cctgctcatg gggctgcgcc 60

gtctgcccta catgtggcgc cgcgcgtgc gcccggcgc cgggccctg gcctgggaca 120

ctttcgcca ggacgtgcc cctcggggac cctccgccag gaacgccctc tctccggggc 180

ccgccctcg cgacgtccg ctgcttccc ccggggttca gacacigtg caggctgcac 240

gcggaagctt ccgctccggg atcccgtca gtgcgcccgc cagcccgcgc gcccggggt 300

ccgagccgca accggaattg ggcctctt cctggacctc ggcggagtag accagagcct 360

tcggagagtc ttcagctcag cgttggtctg gcgaggaac cgccttcgcc agccccgcc 420

26/72

tcgccccagc gtcagagccg accigatcgc ggccccggcg gcgcggcccc gcgcctggcc 480
cccgcgagat ctcttcgcgc cccagggccg gccgtctggt caataaaacc cgcctagttc 540
ctgcgaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 588

<210> 52

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 52

ttcccagacac cccgcgccc agac 24

<210> 53

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 53

gggctggcga aggcgttcc ctgc 24

<210> 54

<211> 565

<212> DNA

27/72

<213> Porcine

<400> 54

```

cctccggagc cagttcctgg tccgccccgc cgggagccgt cagcatgaac ccccgggcac   60
gcggcatggg agcgcggggc ccgggaccgg gggccactgc gaggcgccgg ctgctggcat  120
tgctgttact gctgctgctg ctgccgtgc ccgccgtgc ctggtacaag cacacggcga  180
gtccccgcta ccacacggtg ggccgcgccg cgggccctgt catggggctg cgccgctcgc  240
cctacatgig gcgccgcgcg ctgcgcccg cggccgggcc cctggcctgg gacactttcg  300
gccaggacgt gccccctcgg ggaccctccg ccaggaacgc cctctctccg gggcccgccc  360
ctcgcgacgc tccgtgctt cccccgggg ttcagacact gttgcaggig cgacgcggaa  420
gtttccgctc cgggatcccg gtcagtgcgc cccgcagccc gcgcgcccg ggttcggagc  480
cgcaaccgga attgggcgcc tcttcttgga cctcggcgga gtagaccaga gccttcggag  540
agtcttcagc tcagcggtgg tctgc                                         565

```

<210> 55

<211> 159

<212> PRT

<213> Porcine

<400> 55

```

Met Asn Pro Arg Ala Arg Gly Met Gly Ala Arg Gly Pro Gly Pro Gly
1           5           10          15
Ala Thr Ala Arg Arg Arg Leu Leu Ala Leu Leu Leu Leu Leu Leu
20          25          30
Leu Pro Leu Pro Ala Arg Ala Trp Tyr Lys His Thr Ala Ser Pro Arg
35          40          45
Tyr His Thr Val Gly Arg Ala Ala Gly Leu Leu Met Gly Leu Arg Arg
50          55          60
Ser Pro Tyr Met Trp Arg Arg Ala Leu Arg Pro Ala Ala Gly Pro Leu

```

28/72

65 70 75 80
Ala Trp Asp Thr Phe Gly Gln Asp Val Pro Pro Arg Gly Pro Ser Ala
 85 90 95
Arg Asn Ala Leu Ser Pro Gly Pro Ala Pro Arg Asp Ala Pro Leu Leu
 100 105 110
Pro Pro Gly Val Gln Thr Leu Trp Gln Val Arg Arg Gly Ser Phe Arg
 115 120 125
Ser Gly Ile Pro Val Ser Ala Pro Arg Ser Pro Arg Ala Arg Gly Ser
 130 135 140
Glu Pro Gln Pro Glu Leu Gly Ala Ser Ser Trp Thr Ser Ala Glu
145 150 155

<210> 56

<211> 23

<212> PRT

<213> Porcine

<400> 56

Trp Tyr Lys His Thr Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala
1 5 10 15
Ala Gly Leu Leu Met Gly Leu
20

<210> 57

<211> 30

<212> PRT

<213> Porcine

<400> 57

29/72

Trp Tyr Lys His Thr Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala

1 5 10 15

Ala Gly Leu Leu Met Gly Leu Arg Arg Ser Pro Tyr Met Trp

20 25 30

<210> 58

<211> 69

<212> DNA

<213> Porcine

<400> 58

tggtacaagc acacggcgag tccccgtac cacacggtgg gccgcgccgc gggcctgctc 60

atggggctg 69

<210> 59

<211> 90

<212> DNA

<213> Porcine

<400> 59

tggtacaagc acacggcgag tccccgtac cacacggtgg gccgcgccgc gggcctgctc 60

atggggctgc gccgctcgcc ctacatgtgg 90

<210> 60

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

30/72

<223> Primer

<400> 60

cgttctcggg gacataaacc ctg 23

<210> 61

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 61

atgagcagcc cggaggcacg acc 23

<210> 62

<211> 188

<212> DNA

<213> Rat

<400> 62

ttcttgtcct aaccgcca	ggggccatgg acttgagcgc	gctggcgtcg agcagagaag	60
tacggggccc tgggccggg	gctccggtga accggcccct	gctaccgcta ctgctgcttc	120
tgctcttgct acctctgcc	gccagcgcct ggtacaagca	cgtggcgagc cctcgtatc	180
acacagtg			188

<210> 63

<211> 23

31/72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 63

atgagcagcc cggaggcacg acc 23

<210> 64

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 64

actgtgtgat agcgagggt cgc 23

<210> 65

<211> 615

<212> DNA

<213> Rat

<400> 65

ctcagagctg tactaggcag gaagaggac ggccctcagg gaagggtggc cctatgctta 60
aaactttcct gtctcctctc cataagtgt ccactttag caactcctac caagggggca 120
tccttttgcc cctggcagcc catccttgta ttctgagacc atgcatggta ccagaactcc 180

32/72

ctccctgaca gttcccttcc tgggggag gaaaggtaa gcaaggagat cccccactaa 240
agcttcaagc gcagtcagc ttgcgacta ctcatggga ggcttctagc taccgggtt 300
ccctcttctc cctccctctc catcctctc tcccttgggc atgtgccgcg ggggcgagcc 360
ggggcggggc cattgagaag cgtagtcgc accaactgac tagtctctc catcctccgg 420
agctccgacg ttctcggga cataaacct gtcttctgcc taaccgcca aggggccatg 480
gactigagcg cgctggcgc gagcagagaa gtacggggcc ctgggcccg ggctccggtg 540
aaccggcccc tgctaccgt actgctgctt ctgctctgc tacctctgcc cgccagcgcc 600
tggtacaagc acgtg 615

<210> 66

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 66

cgctctcggg gacataaacc ctg 23

<210> 67

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 67

33/72

cgagccctcg ctatcacaca gtgg 24

<210> 68

<211> 497

<212> DNA

<213> Rat

<400> 68

```
gtcgtgcctc cgggctgctc atggggctgc gccgctcgcc ctacctgtgg cgccgtgcct 60
tgggtggggc cgctggaccg ctcgiggggc tcccgggaca gatggccgc agcgctctcc 120
tccttccttc ccccgggcag gagctgiggg aggtacgaag caggagtica ccggcaggac 180
ttcccgigca tgcaaccggg agtcgcggg acctggaggg agcctggccaa cctgagcagt 240
cgctaagctt tcagtcctgg acttcagcag agcccgctgc tagagccttc ggtgagacgc 300
ttcgtgcca gccatggttc ctgcagcaaa tcattttgc cgatccgtc aggctcgacg 360
accgtctcaa gaaccgatgg cgccccgtg cttagacctaa gcaggagcac agctttagc 420
tccagtcagg tctcgtgtgc tggtaataa aatcactctg attcccaaaa aaaaaaaaaa 480
aaaaaaaaa aaaaaaa 497
```

<210> 69

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 69

ggggcggggc cattgagaag c 21

34/72

<210> 70

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 70

tgaccagaca acgagaccig a 21

<210> 71

<211> 684

<212> DNA

<213> Rat

<400> 71

```
tgtagtcgca ccaactgact agtcctctcc atcctccgga gctccgacgt tctcggggac 60
ataaaccctg ttcttgtcct aaccgcgcaa ggggccatgg acttgagcgc gctggcgctg 120
agcagagaag tacggggccc tgggcccggg gctccggiga accggcccct gctaccgcta 180
ctgctgcttc tgccttggct acctctgccc gccagcgctt ggtacaagca cgtggcgagc 240
cctcgctatc acacagtggg tcgtgcctcc gggctgctca tggggctgcg ccgctcgccc 300
tacctgtggc gccgtgcctt ggggtggggc gctggaccgc tcgtggggct cccgggacag 360
atggcccga gcgtctctct gcttctctcc cccgggcagg agctgtggga ggtacgaagc 420
aggagttcac cggcaggact tcccgatcat gcaaccgga gcttgcggga cctggaggga 480
gccggccaac ctgagcagtc gctaagcttt cagtcttgga cttcagcaga gcccgctgct 540
agagccctcg gtgagacgct tcgtgcccag ccatggttcc tgcagcaaat catctttgcc 600
gatccigtca ggctcgacga ccgtctcaag aaccgatggc gccccgtgc ttgacctaac 660
caggagcaca gctttagct ccag 684
```

35/72

<210> 72

<211> 185

<212> PRT

<213> Rat

<400> 72

Met Asp Leu Ser Ala Leu Ala Ser Ser Arg Glu Val Arg Gly Pro Gly
 1 5 10 15
 Pro Gly Ala Pro Val Asn Arg Pro Leu Leu Pro Leu Leu Leu Leu Leu
 20 25 30
 Leu Leu Leu Pro Leu Pro Ala Ser Ala Trp Tyr Lys His Val Ala Ser
 35 40 45
 Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala Ser Gly Leu Leu Met Gly Leu
 50 55 60
 Arg Arg Ser Pro Tyr Leu Trp Arg Arg Ala Leu Gly Gly Ala Ala Gly
 65 70 75 80
 Pro Leu Val Gly Leu Pro Gly Gln Met Ala Arg Ser Ala Leu Leu Leu
 85 90 95
 Pro Ser Pro Gly Gln Glu Leu Trp Glu Val Arg Ser Arg Ser Ser Pro
 100 105 110
 Ala Gly Leu Pro Val His Ala Thr Arg Ser Leu Arg Asp Leu Glu Gly
 115 120 125
 Ala Gly Gln Pro Glu Gln Ser Leu Ser Phe Gln Ser Trp Thr Ser Ala
 130 135 140
 Glu Pro Ala Ala Arg Ala Phe Gly Glu Thr Leu Arg Ala Gln Pro Trp
 145 150 155 160
 Phe Leu Gln Gln Ile Ile Phe Ala Asp Pro Val Arg Leu Asp Asp Arg
 165 170 175

36/72

Leu Lys Asn Arg Trp Arg Pro Arg Ala

180

185

<210> 73

<211> 23

<212> PRT

<213> Rat

<400> 73

Trp Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala

1

5

10

15

Ser Gly Leu Leu Met Gly Leu

20

<210> 74

<211> 30

<212> PRT

<213> Rat

<400> 74

Trp Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala

1

5

10

15

Ser Gly Leu Leu Met Gly Leu Arg Arg Ser Pro Tyr Leu Trp

20

25

30

<210> 75

<211> 69

<212> DNA

<213> Rat

37/72

<400> 75

tggtacaagc acgtggcgag ccctcgctat cacacagtgg gtcgtgccic cgggctgctc 60
atggggctg 69

<210> 76

<211> 90

<212> DNA

<213> Rat

<400> 76

tggtacaagc acgtggcgag ccctcgctat cacacagtgg gtcgtgccic cgggctgctc 60
atggggctgc gccgctcgcc ctaccctgtg 90

<210> 77

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe

<400> 77

ttcatcctca acctggccat cgc 23

<210> 78

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

38/72

<220>

<223> Primer

<400> 78

accagttct tgcctaacc ctcc 24

<210> 79

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 79

cctgcttcgt acctcccaca gctc 24

<210> 80

<211> 311

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 80

```
aaggggcaat tgacgtgagc gcgctggcgt ctaacagaga agtacggggc cctgggcccc 60
ggactcccag gaaccggccc ctgctgcccc tgctgtgct tctgtcttg ctaccgtgc 120
ccgccagcgc ctggtataag cacgtggcga gtccccgta tcacacagt ggtcgtgcct 180
ccgggctgct catggggctg cgccgctcgc cctaccagt gcgccgtgc ctgggcgggg 240
ctgttgacc cctctcccgg ctcccaggac cggctgcccc cggcgtctc ctgcttctt 300
cttcagggca g 311
```

39/72

<210> 81

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 81

catgagcagc ccggaggcac gacc 24

<210> 82

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 82

gigatagcgg ggactcgcca cgtg 24

<210> 83

<211> 237

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 83

40/72

aaaggctgta gtcgcaccaa ctgactggtc tccatccict ggagctccga cgtgctcgtt 60
ctcggagaca taaaccaggt tctgtccta accctccaag gggcaattga cgtgagcgcg 120
ctggcgctta acagagaagt acggggccct gggcccgga ctcccaggaa ccggcccctg 180
ctgcccctgc tgctgttct gctcttgcta ccgctgcccg ccagcgctg gtataag 237

<210> 84

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 84

accagttct tgtcctaacc ctcc 24

<210> 85

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 85

gggcaattga cgtgagcgcg ctgg 24

<210> 86

<211> 598

41/72

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 86

```
cgictaacag agaagtacgg ggccctgggc ccgggactcc caggaaccgg cccctgctgc   60
ccctgctgct gcttcgctc ttgctaccgc tgcccgccag cgccctggtat aagcacgtgg  120
cgagtcctcg ctatcacaca gtgggtcgtg cctccgggct gtcatagggg ctgcgccgct  180
cgccctacca gtggcgccgt gccctgggcg gggctgctgg acccctctcc cggctcccag  240
gaccggtcgc ccgcggcgct ctccctgctc ctctctcagg gcaggagctg tgggaggtac  300
gaagcaggag ctacactgca gggcttcccg tccatgcacc ctggagtccg cgggacctgg  360
agggagtccg ccaaccggag cagtcgctaa gccctcactc ctggatctca gaggagcccg  420
ctgctagagc ctccggagag acgcttcgtg cccagccaig gtccctgcag caagtcact  480
ttgccgatcc tgtcaggccc aagaaccgat ggcgcccca tgctigacct aggcaggagc  540
acagcttgaa gctccagtca ggctctgtgt ttctgggtcaa taaaaccaac ctgattcc  598
```

<210> 87

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 87

aaaggctgta gtcgcaccaa c 21

<210> 88

<211> 21

<212> DNA

42/72

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 88

accagaaaca cgaggcctga c 21

<210> 89

<211> 659

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 89

```
tgactgggtct ccattctctg gagctccgac gtgctcgttc tcggagacat aaaccagtt 60
cttgtcctaa ccctccaagg ggcaattgac gtgagcgcgc tggcgtctaa cagagaagta 120
cggggccctg ggcccgggac tcccaggaac cggccctgc tgccctgct gctgtttctg 180
ctcttgctac cgctgcccgc cagcgcctgg tataagcacg tggcgagtc ccgtatcac 240
acagtgggtc gtgcctccgg gctgctcatg gggctgcgcc gctcgcccta ccagtggcgc 300
cgtgccctgg gcggggctgc tggaccctc tcccggtcc caggaccggt cgcccgcggc 360
gctctcctgc ttcttcctc agggcaggag ctgtgggagg tacgaagcag gagctcacct 420
gcagggttc ccgtccatgc acctggagt ccgcgggacc tggaggagt ccgccaaccg 480
gagcagtcgc taagccttca ctctggatc tcagaggagc ccgtgctag agccttcgga 540
gagacgcttc gtgccagcc atggttctg cagcaagtca tccttgccga tcctgtcagg 600
cccaagaacc gatggcgccc ccatgcttga cctaggcagg agcacagctt gaagctcca 659
```

<210> 90

<211> 176

<212> PRT

43/72

<213> Mouse

<400> 90

Leu Ala Ser Asn Arg Glu Val Arg Gly Pro Gly Pro Gly Thr Pro Arg
1 5 10 15
Asn Arg Pro Leu Leu Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu
 20 25 30
Pro Ala Ser Ala Trp Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr
 35 40 45
Val Gly Arg Ala Ser Gly Leu Leu Met Gly Leu Arg Arg Ser Pro Tyr
 50 55 60
Gln Trp Arg Arg Ala Leu Gly Gly Ala Ala Gly Pro Leu Ser Arg Leu
65 70 75 80
Pro Gly Pro Val Ala Arg Gly Ala Leu Leu Leu Pro Ser Ser Gly Gln
 85 90 95
Glu Leu Trp Glu Val Arg Ser Arg Ser Ser Pro Ala Gly Leu Pro Val
 100 105 110
His Ala Pro Trp Ser Pro Arg Asp Leu Glu Gly Val Arg Gln Pro Glu
 115 120 125
Gln Ser Leu Ser Leu His Ser Trp Ile Ser Glu Glu Pro Ala Ala Arg
 130 135 140
Ala Phe Gly Glu Thr Leu Arg Ala Gln Pro Trp Phe Leu Gln Gln Val
145 150 155 160
Ile Phe Ala Asp Pro Val Arg Pro Lys Asn Arg Trp Arg Pro His Ala
 165 170 175

<210> 91

<211> 23

<212> PRT

44/72

<213> Mouse

<400> 91

Trp Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala

1 5 10 15

Ser Gly Leu Leu Met Gly Leu

20

<210> 92

<211> 30

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 92

Trp Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala

1 5 10 15

Ser Gly Leu Leu Met Gly Leu Arg Arg Ser Pro Tyr Gln Trp

20 25 30

<210> 93

<211> 69

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 93

tggataagc acgtggcgag tccccgtat cacacagtgg gtcgtgcctc cggcctgctc 60

atggggctg 69

<210> 94

45/72

<211> 90

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 94

tggtataagc acgtggcgag tccccgctat cacacagtgg gtcgtgccctc cgggctgctc 60
atggggctgc gccgctcgcc ctaccagtgg 90

<210> 95

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221>

<222> 21

<223> Xaa on the 21st position means Met (0)

<400> 95

Trp Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala

1 5 10 15

Ala Gly Leu Leu Xaa Gly Leu

20

<210> 96

<211> 22

<212> PRT

<213> Human

46/72

<400> 96

Trp Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala

1 5 10 15

Ala Gly Leu Leu Met Gly

20

<210> 97

<211> 21

<212> PRT

<213> Human

<400> 97

Trp Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala

1 5 10 15

Ala Gly Leu Leu Met

20

<210> 98

<211> 20

<212> PRT

<213> Human

<400> 98

Trp Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala

1 5 10 15

Ala Gly Leu Leu

20

<210> 99

47/72

<211> 19

<212> PRT

<213> Human

<400> 99

Trp Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala

1 5 10 15

Ala Gly Leu

<210> 100

<211> 18

<212> PRT

<213> Human

<400> 100

Trp Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala

1 5 10 15

Ala Gly

<210> 101

<211> 17

<212> PRT

<213> Human

<400> 101

Trp Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala

1 5 10 15

Ala

48/72

<210> 102

<211> 16

<212> PRT

<213> Human

<400> 102

Trp Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala
1 5 10 15

<210> 103

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221>

<222> 21

<223> Xaa on the 21st position means Met (0)

<400> 103

Trp Tyr Lys His Thr Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala
1 5 10 15

Ala Gly Leu Leu Xaa Gly Leu

20

<210> 104

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

49/72

<220>

<221>

<222> 21

<223> Xaa on the 21st position means Met (0)

<400> 104

Trp Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala

1

5

10

15

Ser Gly Leu Leu Xaa Gly Leu

20

<210> 105

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221>

<222> 1

<223> Xaa on the 1st position means Fmoc Trp

<400> 105

Xaa Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala

1

5

10

15

Ala Gly Leu Leu Met Gly Leu

20

<210> 106

50/72

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221>

<222> 1

<223> Xaa on the 1st position means Ac Trp

<400> 106

Xaa Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala

1 5 10 15

Ala Gly Leu Leu Met Gly Leu

20

<210> 107

<211> 22

<212> PRT

<213> Human

<400> 107

Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala Ala

1 5 10 15

Gly Leu Leu Met Gly Leu

20

<210> 108

<211> 20

<212> PRT

51/72

<213> Human

<400> 108

His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala Ala Gly Leu

1 5 10 15

Leu Met Gly Leu

20

<210> 109

<211> 15

<212> PRT

<213> Human

<400> 109

Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala Ala Gly Leu Leu Met Gly Leu

1 5 10 15

<210> 110

<211> 9

<212> PRT

<213> Human

<400> 110

Arg Ala Ala Gly Leu Leu Met Gly Leu

1 5

<210> 111

<211> 22

<212> PRT

52/72

<213> Artificial Sequence

<220>

<221>

<222> 1

<223> Xaa on the 1st position means Ac Tyr

<400> 111

Xaa Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala Ala

1 5 10 15

Gly Leu Leu Met Gly Leu

20

<210> 112

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221>

<222> 1

<223> Xaa on the 1st position means DTrp

<400> 112

Xaa Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala

1 5 10 15

Ala Gly Leu Leu Met Gly Leu

20

53/72

<210> 113

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221>

<222> 1

<223> Xaa on the 1st position means 3-Indolepropanoyl Tyr

<400> 113

Xaa Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala Ala

1

5

10

15

Gly Leu Leu Met Gly Leu

20

<210> 114

<211> 66

<212> DNA

<213> Human

<400> 114

tggtaacaagc acgtggcgag tccccgtac cacacggtgg gccgcgccgc tggcctgctc 60

atgggg

66

<210> 115

<211> 63

<212> DNA

<213> Human

54/72

<400> 115

tggtacaagc acgtggcgag tccccgtac cacacggtgg gccgcgccgc tggcctgctc 60
atg . 63

<210> 116

<211> 60

<212> DNA

<213> Human

<400> 116

tggtacaagc acgtggcgag tccccgtac cacacggtgg gccgcgccgc tggcctgctc 60

<210> 117

<211> 57

<212> DNA

<213> Human

<400> 117

tggtacaagc acgtggcgag tccccgtac cacacggtgg gccgcgccgc tggcctg 57

<210> 118

<211> 54

<212> DNA

<213> Human

<400> 118

tggtacaagc acgtggcgag tccccgtac cacacggtgg gccgcgccgc tggc 54

55/72

<210> 119

<211> 51

<212> DNA

<213> Human

<400> 119

tggtacaagc acgtggcgag tccccgctac cacacggtgg gccgcgccgc t 51

<210> 120

<211> 48

<212> DNA

<213> Human

<400> 120

tggtacaagc acgtggcgag tccccgctac cacacggtgg gccgcgcc 48

<210> 121

<211> 66

<212> DNA

<213> Human

<400> 121

tacaagcacg tggcgagtc cgcctaccac acggtgggcc gcgccgctgg cctgctcatg 60
gggctg 66

<210> 122

<211> 60

<212> DNA

<213> Human

56/72

<400> 122

cacgtggcga gtccccgcta ccacacggig ggccgcgccg ctggcctgct catggggctg 60

<210> 123

<211> 45

<212> DNA

<213> Human

<400> 123

cgctaccaca cggtagggccg cgccgctggc ctgctcatgg ggctg 45

<210> 124

<211> 27

<212> DNA

<213> Human

<400> 124

cgcgccgctg gccctgctcat ggggctg 27

<210> 125

<211> 51

<212> DNA

<213> Porcine

<400> 125

tggtacaagc acacggcgag tccccgtac cacacggtgg gccgcgccg g 51

<210> 126

57/72

<211> 329

<212> PRT

<213> Rat

<400> 126

Met His Asn Leu Ser Leu Phe Glu Pro Gly Arg Gly Asn Val Ser Cys
5 10 15

Gly Gly Pro Phe Leu Gly Cys Pro Asn Glu Ser Asn Pro Ala Pro Leu
20 25 30

Pro Leu Pro Gln Pro Leu Ala Val Ala Val Pro Val Val Tyr Gly Val
35 40 45

Ile Cys Ala Val Gly Leu Ala Gly Asn Ser Ala Val Leu Tyr Val Leu
50 55 60

Leu Arg Thr Pro Arg Met Lys Thr Val Thr Asn Val Phe Ile Leu Asn
65 70 75 80

Leu Ala Ile Ala Asp Glu Leu Phe Thr Leu Val Leu Pro Ile Asn Ile
85 90 95

Ala Asp Phe Leu Leu Arg Arg Trp Pro Phe Gly Glu Val Met Cys Lys
100 105 110

Leu Ile Val Ala Val Asp Gln Tyr Asn Thr Phe Ser Ser Leu Tyr Phe
115 120 125

Leu Ala Val Met Ser Ala Asp Arg Tyr Leu Val Val Leu Ala Thr Ala
130 135 140

Glu Ser Arg Arg Val Ser Gly Arg Thr Tyr Gly Ala Ala Arg Ala Val
145 150 155 160

Ser Leu Ala Val Trp Ala Leu Val Thr Leu Val Val Leu Pro Phe Ala
165 170 175

Val Phe Ala Arg Leu Asp Glu Glu Gln Gly Arg Arg Gln Cys Val Leu
180 185 190

58/72

Val Phe Pro Gln Pro Glu Ala Phe Trp Trp Arg Ala Ser Arg Leu Tyr
 195 200 205
 Thr Leu Val Leu Gly Phe Ala Ile Pro Val Ser Thr Ile Cys Ala Leu
 210 215 220
 Tyr Ile Thr Leu Leu Cys Arg Leu Arg Ala Ile Gln Leu Asp Ser His
 225 230 235 240
 Ala Lys Ala Leu Asp Arg Ala Lys Lys Arg Val Thr Leu Leu Val Val
 245 250 255
 Ala Ile Leu Ala Val Cys Leu Leu Cys Trp Thr Pro Tyr His Leu Ser
 260 265 270
 Thr Ile Val Ala Leu Thr Thr Asp Leu Pro Gln Thr Pro Leu Val Ile
 275 280 285
 Gly Ile Ser Tyr Phe Ile Thr Ser Leu Ser Tyr Ala Asn Ser Cys Leu
 290 295 300
 Asn Pro Phe Leu Tyr Ala Phe Leu Asp Asp Ser Phe Arg Arg Ser Leu
 305 310 315 320
 Arg Gln Leu Val Ser Cys Arg Thr Ala
 325

<210> 127

<211> 987

<212> DNA

<213> Rat

<400> 127

atgcacaact tgtcgctctt cgagcctggc aggggcaatg tgtcttgcgg cgccccattt 60
 ttgggctgtc ctaacgagtc gaaccagcg cctctgccac tgccgcagcc tctggcggta 120
 gcagtgcctg tggctciacgg ggtgatctgc gcggtgggac tggcgggcaa ctccgcggtg 180
 ctgtacgtac tgctgcgcac gccgcgatg aagactgtta ccaacgtgtt cattctcaac 240

59/72

ctggctatcg cggacgagct ctccaccctc gtgctgcca tcaacatcgc ggacttcctg 300
ctgaggcgct ggcccttcgg ggaagtcag tgcaagctca tcgtggctgt cgaccagtac 360
aacactttct ctagcctcta ctccctcgcc gtcagagcg cagaccgcta cctggttgtc 420
ctggccacag ccgagtcgcg ccgggtgtcc gggcgacatt atggtcagc gcgggctgtc 480
agtctggcgg tgtgggcgct ggtgacattg gtgctgtgc cttttgcggt attcgcccg 540
ctggacgaag agcagggtcg gcgtcagtc gtgctgtct tccgcagcc tgaggccttc 600
tggtagcgcg ccagccgctc gtacactcta gtgttgggt tcgcatccc ggtgtccacc 660
atctgcgccc tctatatcac cctgttgtc cgactgcgtg ctatccagct agacagccac 720
gccaaggccc tggaccgtgc caagaagcg gtgacctgt tggtagtggc gattctggct 780
gtgtgcctcc tctgtggac accgtaccac ctgagacca tagtggcgt caccaccgac 840
ctcccgaaa caccgttgg catcgcatc tctactica tcaccagtct gagctatgcc 900
aacagctgcc tcaacccttt cctctatgcc ttctggacg acagcttcg caggagcctg 960
cggcagctgg tgtcatgcc cacagcc 987

<210> 128

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 128

actgatatgc acaacttgc gctcttcg 28

<210> 129

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

60/72

<220>

<223> Primer

<400> 129

actagttcag gctgtgcggc atgacacc 28

<210> 130

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 130

gttgggtggtg gcgattctg 19

<210> 131

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 131

tggtagcgc cactatggt 19

61/72

<210> 132

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 132

gtccgcgatg ttgatgggca gcac

24

<210> 133

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 133

gaagagctca tcggcgatag ccag

24

<210> 134

<211> 440

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 134

taagcagtgg taacaacgca gagiaccgagg gggcgcataa gcagtggtaa caacgcagag 60

62/72

tcacgcgggg agtgccctggg tgcagatccc tgtaaactg ggcgcataaa cctcgagttt 120
cgcggggcig ctagatggaa tcctgggtgt cgccigtctt ccagccctct ccaagatgca 180
taacttaacg cttttcgagt ctggagggga caacgtgtct tgcggcggct catctttggg 240
ctgtcccaac gggtcagcc tggctcctct gccgtgccg cagccactgg cggtagcagt 300
gccgtgcgtc tacggggtaa ttgcgccgt gggactggct ggcaactctg cggtgctgta 360
cgtactgctg cgcacgccgc gcatgaagac tgtaccaac gtgttcatcc tcaacctggc 420
tatcgccgat gagctcttca 440

<210> 135

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 135

tttcgcgggg ctgctgagtg gaat 24

<210> 136

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 136

agtgtgcct gcggtggaaa gagg 24

63/72

<210> 137

<211> 1083

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 137

```
tttcgcgggg ctgcigagtg gaatcctggt ggtcgccctgc tctccagccc tctccaagat 60
gcataactta acgcittttcg agtctggagg ggacaacgig tcttgcggcg gctcatcttt 120
gggcigtccc aacgggtcca gccitggctcc tctgccgcig ccgcagccac tggcggtagc 180
agtgcctgtc gtctacgggg taatttgcgc cgigggacig gctggcaact ctgcggtgct 240
gtacgtactg ctgcgcacgc cgcgatgaa gactgtcacc aacgigtica tcttcaacct 300
ggctatcgcc gatgagctct taccctcgt gctgcccac aacatcgcg acttctgct 360
gaggcgcttg ccttcgggg aggtcatgtg caagctcatt gtagccgtcg accagtacaa 420
cactttctct agcctctact tctcgccgt catgagcgcc gaccgatacc tggtggttct 480
ggccacagca gaticgcgcc ggggtccgg gcgcacitac ggtgcagcgc gtgctgtcag 540
tctggcggtg tgggcgtgg tgacgtggt cgigctgccc tttgcggtat tcgtcggct 600
ggacgaggag cagggtcggc gccagtgcgt gctggcttcc ccgcagcccg aggccittctg 660
gtggcgtgcc agccgtctct acacactagt attgggcttt gccatcccgg tgaccaccat 720
ctgtgtcttc tataccactc tgcctgcgc actgcgtgct atccagctag atagccacgc 780
caaggccctg gatcgtgcca agaagcgcgt gaccittgtg gtggcggcga ttctggctgt 840
gtgcctcttc tgcgtgacgc cttatcacct gagtaccata gtggccctca ccaccgacct 900
cccgaaaacg ccgtgggtca tcggcatctc ttacttcate accagcctga gctatgctaa 960
cagctgcctc aacctttcc tctatgcctt cctggacgac agcttccgca gaagcctccg 1020
gcaattgggt tcatgccgtt cagcctgatg cctttccac ctctttccac cgcaggcagc 1080
act 1083
```

<210> 138

<211> 329

64/72

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 138

Met His Asn Leu Thr Leu Phe Glu Ser Gly Gly Asp Asn Val Ser Cys
 5 10 15
 Gly Gly Ser Ser Leu Gly Cys Pro Asn Gly Ser Ser Leu Ala Pro Leu
 20 25 30
 Pro Leu Pro Gln Pro Leu Ala Val Ala Val Pro Val Val Tyr Gly Val
 35 40 45
 Ile Cys Ala Val Gly Leu Ala Gly Asn Ser Ala Val Leu Tyr Val Leu
 50 55 60
 Leu Arg Thr Pro Arg Met Lys Thr Val Thr Asn Val Phe Ile Leu Asn
 65 70 75 80
 Leu Ala Ile Ala Asp Glu Leu Phe Thr Leu Val Leu Pro Ile Asn Ile
 85 90 95
 Ala Asp Phe Leu Leu Arg Arg Trp Pro Phe Gly Glu Val Met Cys Lys
 100 105 110
 Leu Ile Val Ala Val Asp Gln Tyr Asn Thr Phe Ser Ser Leu Tyr Phe
 115 120 125
 Leu Ala Val Met Ser Ala Asp Arg Tyr Leu Val Val Leu Ala Thr Ala
 130 135 140
 Glu Ser Arg Arg Val Ser Gly Arg Thr Tyr Gly Ala Ala Arg Ala Val
 145 150 155 160
 Ser Leu Ala Val Trp Ala Leu Val Thr Leu Val Val Leu Pro Phe Ala
 165 170 175
 Val Phe Ala Arg Leu Asp Glu Glu Gln Gly Arg Arg Gln Cys Val Leu
 180 185 190
 Val Phe Pro Gln Pro Glu Ala Phe Trp Trp Arg Ala Ser Arg Leu Tyr

65/72

195	200	205
Thr Leu Val Leu Gly Phe Ala Ile Pro Val Thr Thr Ile Cys Ala Leu		
210	215	220
Tyr Thr Thr Leu Leu Cys Arg Leu Arg Ala Ile Gln Leu Asp Ser His		
225	230	235
Ala Lys Ala Leu Asp Arg Ala Lys Lys Arg Val Thr Leu Leu Val Ala		
245	250	255
Ala Ile Leu Ala Val Cys Leu Leu Cys Trp Thr Pro Tyr His Leu Ser		
260	265	270
Thr Ile Val Ala Leu Thr Thr Asp Leu Pro Gln Thr Pro Leu Val Ile		
275	280	285
Gly Ile Ser Tyr Phe Ile Thr Ser Leu Ser Tyr Ala Asn Ser Cys Leu		
290	295	300
Asn Pro Phe Leu Tyr Ala Phe Leu Asp Asp Ser Phe Arg Arg Ser Leu		
305	310	315
Arg Gln Leu Val Ser Cys Arg Ser Ala		
325		

<210> 139

<211> 987

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 139

```

atgcataact taacgcitit cgagctctgga ggggacaacg tgtcttgccg cggtcctct 60
ttgggctgtc ccaacgggtc cagcctggct cctctgccgc tgccgcagcc actggcggtg 120
gcagtgccig tcgtctacgg ggtaatitgc gccgtgggac tggctggcaa ctctgcggtg 180
ctgtacgtac tgctgcgcac gccgcgatg aagactgica ccaacgtgtt catcctaac 240
ctggctatcg ccgatgagct cttcaccctc gtgctgccca tcaacatcgc ggacttcctg 300

```

66/72

ctgaggcgct ggcccttcgg ggaggtcatg tgcaagctca ttgtagccgt cgaccagtac 360
aacacittct ctagecctcta cttcctcgcc gtcatgagcg ccgaccgata cctggigggt 420
ctggccacag cagagtcgcg ccgggtgtcc gggcgcactt acggtgcagc gcgtgctgtc 480
agtctggcgg tgtgggcgct ggtgacgctg gtctgtctgc cctttgcggt attcgctcgg 540
ctggacgagg agcagggtcg gcgccagtgc gtgctggtct tcccgagcc cgaggccttc 600
tggtggcgtg ccagccgtct ctacacacta gtattgggt ttgccatccc ggtgaccacc 660
atctgtgtc tctataccac tctgtctgc cgactgcgtg ctatccagct agatagccac 720
gccaaagccc tggatcgtgc caagaagcgc gtgaccttgt tggtagcggc gattctggct 780
gtgtgcctcc tcgtctggac gccttatcac ctgagtacca tagtggcct caccaccgac 840
ctcccgaaa cgccgtgtgt catcggcac tcttacttca tcaccagcct gagctatgct 900
aacagctgcc tcaaccttt cctctatgcc ttccaggacg acagcttcg cagaagcctc 960
cggcaattgg tgtcatgcc tttagcc 987

<210> 140

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe

<400> 140

tcctctgctg gacaccgtac cacctga 27

<210> 141

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

67/72

<220>

<223> Primer

<400> 141

atcgatatgg acaacgcctc gtctcggag cc 32

<210> 142

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 142

actagtgtca ggctgccgcg cggcaagtta tc 32

<210> 143

<211> 1000

<212> DNA

<213> Human

<400> 143

atcgatatgg acaacgcctc gtctcggag ccctggcccg ccaacgcac gggcccgac 60
ccggcgctga gctgtccaa cgcgtcgact ctggcgccgc tgccggcgcc gctggcggtg 120
gctgtaccag ttgtctacgc ggtgatctgc gccgtgggtc tggcgggcaa ctccgccgtg 180
ctgtacgtgt tgctgcgggc gcccgcaltg aagaccgtca ccaacctgt catctcaac 240
ctggccatcg ccgacgagct cttcacgtg gtgctgccca tcaacatcg cgacttcctg 300
ctgcggcagt ggcccttcgg ggagctcatg tgcaagctca tctggctat cgaccagtac 360

68/72

aacaccttct ccagcctcia ctctctcacc gtcattgagcg ccgaccgcta cctgggtggg 420
 ttggccactg cggagtcgcg ccgggtggcc ggccgcacct acagcgccgc gcgcgcggig 480
 agcctggccg tgtgggggat cgtcacactc gtctgtctgc ccttcgcagt cttcgcccgg 540
 cttagcgacg agcagggccg gcgccagtgc gtgctagtct ttccgcagcc cgaggccttc 600
 tgggtggcgc cgagccgcct ctacacgctc gtgctgggct tcgccatccc cgtgtccacc 660
 atctgtgtcc tctataccac cctgtctgtc cggctgcatg ccatgcggct ggacagccac 720
 gccaaagccc tggagcgcg caagaagcgg gtgaccttc tgggtggc aatcctggcg 780
 gtgtgcctcc tctgtggac gccctaccac ctgagcaccg tgggtggcgt caccaccgac 840
 ctccgcgaga cgccgtggt catcgtatc tctacttca tcaccagcct gagctacgcc 900
 aacagctgcc tcaaccctt cctctacgcc ttctggacg ccagcttcg caggaacctc 960
 cgccagctga taacttgccg cgcgccagcc tgacactagt 1000

<210> 144

<211> 328

<212> PRT

<213> Human

<400> 144

Met Asp Asn Ala Ser Phe Ser Glu Pro Trp Pro Ala Asn Ala Ser Gly
 1 5 10 15
 Pro Asp Pro Ala Leu Ser Cys Ser Asn Ala Ser Thr Leu Ala Pro Leu
 20 25 30
 Pro Ala Pro Leu Ala Val Ala Val Pro Val Val Tyr Ala Val Ile Cys
 35 40 45
 Ala Val Gly Leu Ala Gly Asn Ser Ala Val Leu Tyr Val Leu Leu Arg
 50 55 60
 Ala Pro Arg Met Lys Thr Val Thr Asn Leu Phe Ile Leu Asn Leu Ala
 65 70 75 80
 Ile Ala Asp Glu Leu Phe Thr Leu Val Leu Pro Ile Asn Ile Ala Asp

69/72

	85	90	95
Phe Leu Leu Arg Gln Trp Pro Phe Gly Glu Leu Met Cys Lys Leu Ile			
100	105	110	
Val Ala Ile Asp Gln Tyr Asn Thr Phe Ser Ser Leu Tyr Phe Leu Thr			
115	120	125	
Val Met Ser Ala Asp Arg Tyr Leu Val Val Leu Ala Thr Ala Glu Ser			
130	135	140	
Arg Arg Val Ala Gly Arg Thr Tyr Ser Ala Ala Arg Ala Val Ser Leu			
145	150	155	160
Ala Val Trp Gly Ile Val Thr Leu Val Val Leu Pro Phe Ala Val Phe			
165	170	175	
Ala Arg Leu Asp Asp Glu Gln Gly Arg Arg Gln Cys Val Leu Val Phe			
180	185	190	
Pro Gln Pro Glu Ala Phe Trp Trp Arg Ala Ser Arg Leu Tyr Thr Leu			
195	200	205	
Val Leu Gly Phe Ala Ile Pro Val Ser Thr Ile Cys Val Leu Tyr Thr			
210	215	220	
Thr Leu Leu Cys Arg Leu His Ala Met Arg Leu Asp Ser His Ala Lys			
225	230	235	240
Ala Leu Glu Arg Ala Lys Lys Arg Val Thr Phe Leu Val Val Ala Ile			
245	250	255	
Leu Ala Val Cys Leu Leu Cys Trp Thr Pro Tyr His Leu Ser Thr Val			
260	265	270	
Val Ala Leu Thr Thr Asp Leu Pro Gln Thr Pro Leu Val Ile Ala Ile			
275	280	285	
Ser Tyr Phe Ile Thr Ser Leu Ser Tyr Ala Asn Ser Cys Leu Asn Pro			
290	295	300	
Phe Leu Tyr Ala Phe Leu Asp Ala Ser Phe Arg Arg Asn Leu Arg Gln			
305	310	315	320

70/72

Leu Ile Thr Cys Arg Ala Ala Ala

325

<210> 145

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 145

atcgatatgg acaacgcctc gttctcggag cc 32

<210> 146

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 146

tagaggctgg agaaggtgtt g 21

<210> 147

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

71/72

<220>

<223> Primer

<400> 147

catgaagacc gtcaccaacc t 21

<210> 148

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer .

<400> 148

ccagcgtgaa gagctcgtc 19

<210> 149

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed peptide

<400> 149

Trp Phe Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala

1

5

10

15

72/72

Ala Gly Leu Leu

20

<210> 150

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 150

tggttcaagc acgtggcgag tccccgtac cacacggtgg gccgcgccgc tggcctgctc 60

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/13781

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K38/00, 45/00, A61P3/04, 3/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K38/00, 45/00, A61P3/04, 3/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1926-1992 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-1996

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-1992 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2003

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 01/98494 A1 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.), 27 December, 2001 (27.12.01), Full text; particularly, sequence listing, sequence Nos. 4, 16, 98 & EP 1293567 A1 & JP 2003-9873 A	1-20, 23 21
Y	JP 9-121865 A (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.), 13 May, 1997 (13.05.97), Claims; Figs. 1, 4 (Family: none)	6, 8, 11, 19-21, 23

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not

considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or

priority date and not in conflict with the application but cited to

understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such

combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

03 April, 2003 (03.04.03)

Date of mailing of the international search report

15 April, 2003 (15.04.03)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/13781

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 95/12670 A1 (Alcoholism and Drug Addiction Research Foundation), 11 May, 1995 (11.05.95), Claims; sequence listing, sequence No. 2 & EP 726949 A1 & JP 9-507022 A	6, 8, 11, 19-21, 23
A	B.F., O'Dowd et al., The cloning and chromosomal mapping of two novel human opioid-somatostatin-like receptor genes, GPR7 and GPR8, expressed in discrete areas of the brain., GENOMICS, 1995, Vol.28, No.1, pages 84 to 91	1-21, 23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/13781

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 22

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 22 involves methods for treatment of the human body by surgery or therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁷ A61K38/00, 45/00, A61P3/04, 3/06		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁷ A61K38/00, 45/00, A61P3/04, 3/06		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1926-1992 日本国公開実用新案公報 1971-1992 日本国登録実用新案公報 1994-1996 日本国実用新案登録公報 1996-2003		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) Swiss Prot/PIR/GeneSeq		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 01/98494 A1 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.)	1-20, 23
Y	2001.12.27 (全文 特に、配列表配列番号4, 16, 98参照) & EP 1293567 A1 & JP 2003-9873 A	21
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 03.04.03	国際調査報告の発送日 15.04.03	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 岩下 直人 電話番号 03-3581-1101 内線 3451	

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 9-121865 A (武田薬品工業株式会社) 1997. 05. 13 特許請求の範囲、図1、図4 (ファミリーなし)	6, 8, 11, 19-21, 23
A	WO 95/12670 A1 (Alcoholism and Drug Addiction Research Foundation) 1995. 05. 11 特許請求の範囲、配列表配列番号2 & EP 726949 A1 & JP 9-507022 A	6, 8, 11, 19-21, 23
A	B. F., O'Dowd et al, The cloning and chromosomal mapping of two novel human opioid-somatostatin-like receptor genes, GPR7 and GPR8, expressed in discrete areas of the brain., GENOMICS, 1995, Vol.28, No.1, pages 84 to 91	1-21, 23

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 22 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲 22 は手術または治療による人体の処置方法を包含するものであるので、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。